Untersuchungen zur physikalischen Kartierung und zur Transkription der DNA des Bakteriophagen T4

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Elisabeth Niggemann
aus Dortmund

Bochum 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549226_0015

Untersuchungen zur physikalischen Kartierung und zur Transkription der DNA des Bakteriophagen T4

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Elisabeth Niggemann
aus Dortmund

Bochum 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Regulation der Genexpression	2
1.2.	Genexpression des Bakteriophagen T4	6
1.3.	Transkriptionsregulation des Bakteriophagen T4	10
1.4.	In vitro-Transkription der DNA des Phagen T4	16
1.5.	Problemstellung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Chemikalien und Enzyme	19
2.2.	Bakterien- und Bakteriophagenstämme, Plasmide	19
2.3.	Vermehrung von Bakteriophagen und Isolation von Bakteriophagen- und Plasmid-DNA	19
2.3.1.	Nährmedien und Puffer zur DNA-Isolation	19
2.3.2.	Isolation von T4 Wildtyp-DNA	22
2.3.3.	Isolation von T4 alc-DNA	22
2.3.4.	Isolation von T4 saΔ9-DNA	23
2.3.5.	Nachweis weiterer Bakteriophagenstämme	23
2.3.6.	Isolation von Plasmid-DNA	24
2.4.	Äthanolfällung von DNA	25
2.5.	Gel-Elektrophorese	25
2.5.1.	Lösungen zur Gel-Elektrophorese	25
2.5.2.	DNA-Agarosegele	27
2.5.3.	RNA-Gele	28
2.5.4.	Polyacrylamidgele	28
2.5.4.1.	Native Polyacrylamidgele	28
2.5.4.2.	DNA-Strangtrennung in Polyacrylamidgelen	29
2.5.4.3.	Sequenzgele	29
2.6.	Isolation von DNA aus Gelen	29
2.6.1.	Diffusionsmethode für Agarosegele	29
2.6.2.	Diffusionsmethode für Polyacrylamidgele	30
2.6.3.	DNA-Isolation aus niedrigschmelzender Agarose	30

		Seite
2.6.4.	Elektroelution	30
2.7.	Isolation und Jodierung von RNA	31
2.8.	Restriktion	32
2.9.	In vitro-Transkription	32
2.10.	Southern-Transfer und Hybridisation	34
2.11.	Klonierung	36
2.11.1.	In vitro-Rekombination von Nukleinsäuren	36
2.11.2.	Transformation von E.coli C600	36
2.11.3.	Klonanalyse mit λφ607	37
2.11.4.	Klonanalyse mit pBR322	38
2.12.	Methoden zur radioaktiven Markierung von DNA	39
2.12.1.	Synthese von γ^{32}P ATP	39
2.12.2.	5'-Endmarkierung von DNA	39
2.12.3.	3'-Endmarkierung von DNA	40
2.12.4.	"Nick Translation"	41
2.13.	DNA-Sequenzierung	41
2.13.1.	Lösungen zur Sequenzierung	42
2.13.2.	Durchführung der DNA-Sequenzierung	43
2.14.	Kartierung von Restriktionsfragmenten	44
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Physikalische Kartierung	47
3.2.	Zuordnung der physikalischen zur genetischen Karte des Bakteriophagen T4	54
3.3.	Lokalisation von Bereichen früher Transkription auf der DNA des Bakteriophagen T4	62
3.3.1.	Hybridisation von in vivo-RNA mit Restriktionsfragmenten der T4 dC-DNA	62
3.3.2.	Identifizierung von in vitro transkribierten Bereichen der T4-DNA	65
3.4.	Kartierung einer in vitro-Transkriptionseinheit	73
3.4.1.	Hybridisation von Restriktionsfragmenten mit dem UpC-Transkript der T4 Wildtyp-DNA	73
3.4.2.	Kartierung zweier Promotoren auf T4 dC-DNA	79

		Seite
3.5.	Versuche zur Klonierung und Sequenzierung eines frühen Promotors des Phagen T4	86
4.	Diskussion	96
4.1.	Physikalische Kartierung der DNA des Phagen T4	96
4.2.	Transkription	102
4.3.	Klonierung und Sequenzierung	111
5.	Zusammenfassung	116
6.	Literaturverzeichnis	117
7.	Anhang	131

Liste der im Text verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D	Dalton
d	desoxy-
DE	"delayed early"
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	(2-Aminoäthyl)-Glycoläther-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, 3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
IE	"immediate early"
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
MW	Molekulargewicht
RNA (t-)	Ribonukleinsäure (transfer-)
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg-Konstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
UpC	Uridylyl-(3'-5')-Cytidin
UTP	Uridintriphosphat

1. EINLEITUNG

Der Bakteriophage T4 ist in morphologischer und genetischer Hinsicht eines der bestuntersuchten biologischen Systeme (Übersicht: Wood & Revel, 1976). Die zeitabhängige Regulation der Genexpression des virulenten Phagen jedoch ist noch nicht aufgeklärt, obwohl sie in den letzten 30 Jahren Objekt intensiver Forschung war (Übersicht: Rabussay & Geiduschek, 1977a). Eine Ursache dafür ist in den strukturellen Besonderheiten der T4-DNA zu sehen: Die DNA des Phagen T4, mit etwa 166 000 bp (Kim & Davidson, 1974) eines der größten viralen Genome, ist zyklisch permutiert (Streisinger et al., 1964, Thomas, 1966) und enthält an Stelle von Cytosin glucosyliertes Hydroxymethylcytosin (Wyatt & Cohen, 1952, Lehman & Pratt, 1960). Diese Modifikation schützt die DNA vor Restriktionsendonukleasen (Kaplan & Nierlich, 1975).

Restriktionsendonukleasen der Klasse II (zur Definition s. Roberts, 1976) erkennen charakteristische Sequenzen auf doppelsträngiger DNA und setzen innerhalb einer für jedes Enzym spezifischen Folge von Nukleotidpaaren einen Doppelstrangbruch (Übersicht über Schnittsequenzen: Roberts, 1980). Dadurch entstehen DNA-Fragmente, die hinsichtlich ihrer Anzahl und ihrer Kettenlänge sowie des Genomabschnitts, den jedes der Fragmente in reproduzierbarer Weise repräsentiert, charakteristisch für das benutzte Restriktionsenzym und für die betreffende DNA-Spezies sind.

Erst die Entwicklung entsprechender T4-Mutanten, die mit Cytosin in der DNA vermehrt werden können (T4 dC-Phagen) (Snyder et al., 1976, Mattson et al., 1977), ermöglichte die Anwendung von Restriktionsenzymen zur Untersuchung definierter T4-DNA-Fragmente. Diese Entwicklung war insofern von ausschlaggebender Bedeutung, als durch die Isolierbarkeit einzelner Genomabschnitte in Form von Restriktionsfragmenten die durch die Größe

des Gesamtgenoms und die zyklische Permutation bedingten Schwierigkeiten überwunden werden konnten.

Nicht zuletzt durch die Methoden der in vitro-Rekombination von Nukleinsäuren, die auf der Anwendung von Restriktionsendonukleasen beruhen, ist es gelungen, das Wissen über einzelne Genbereiche des Phagen T4 erheblich zu erweitern. Beispiele dafür sind die tRNA-Region (Fukada et al., 1980a und b, Fukada & Abelson, 1980), die rII-Region (Pribnow et al., 1981) und der Bereich zwischen den Genen 38 und 30 (Hänggi & Zachau, 1980, Mileham et al., 1980, Krisch & Selzer, 1981, Revel, 1981, Oliver & Crowther, 1981).

1.1. Regulation der Genexpression

Die Regulation der Genexpression ist für jeden Organismus von entscheidender Bedeutung, da erst die Fähigkeit der Zelle, Gene "an- und abzuschalten", eine Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen ermöglicht und die Grundlage jeder Differenzierung ist. Virulente Phagen, denen diese Merkmale zellulären Lebens fehlen, weisen eine zeitabhängig programmierte Genexpression auf, wie am Beispiel des Phagen T4 im Kapitel 1.2. gezeigt wird. Die Regulation dieser Genexpression findet bevorzugt auf der Ebene der Transkription, weniger auf der der Translation statt (Rabussay & Geiduschek, 1977a).

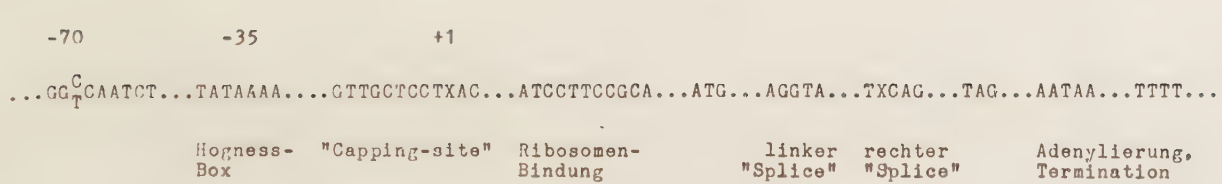
Die Regulation des ersten Schritts der Informationsübertragung, der Transkription, ist ein universell anzutreffendes Element der Genexpression, das besonders intensiv an prokaryotischen Operons untersucht wurde (Übersicht: Rosenberg & Court, 1979). Die Regulation kann sowohl die Initiation der Transkription als auch die Termination betreffen, wie Untersuchungen zur "Attenuation" deutlich gemacht haben (Übersicht: Yanofsky, 1981, Platt, 1981). Die Entscheidung darüber, welche

Information abgerufen wird, wird vor allem durch Protein-DNA-Wechselwirkungen bestimmt. Die Untersuchung des Transkriptionsapparats, d.h. der RNA-Polymerase(n) und zusätzlicher, deren Aktivität und Spezifität verändernder Proteinfaktoren ist ebenso notwendig wie die Untersuchung der DNA-Sequenzen, die von diesen Proteinen erkannt werden und die spezifische Transkription und deren Regulation ermöglichen.

Die Analyse regulatorischer DNA-Regionen wurde erst durch die Entwicklung von Methoden zur DNA-Sequenzierung (Sanger & Coulson, 1975, Sanger et al., 1977a, Maxam & Gilbert, 1977) möglich. Der Vergleich solcher Sequenzen zeigt, daß DNA-Bereiche mit analogen Funktionen bestimmte Merkmale aufweisen, die im Laufe der Evolution weitgehend konserviert wurden. Diese Funktionen betreffen z.B. die Initiation und die Termination der Transkription, das "Processing" und das Binden der Ribosomen an das Transkript. Abbildung 1 zeigt im Vergleich jeweils eine "idealtypische" eukaryotische und prokaryotische Transkriptionseinheit, in denen nur die konservierten Sequenzen in ihrer typischen Ausprägung ("kanonische Sequenz") aufgeführt sind.

Die Promotorregion der Prokaryonten, d.h. die DNA-Sequenz, die von der RNA-Polymerase erkannt wird und an die das Enzym zur Transkriptionsinitiation bindet, wird durch zwei Regionen charakterisiert: die Pribnow-Box, deren kanonische Sequenz T A T A A T etwa zehn Nukleotide vor dem ersten transkribierten Nukleotid, meist einem Adenosin oder Guanosin, liegt, und die -35-Region mit der kanonischen Sequenz T T G A C A (Pribnow, 1975, Maniatis et al., 1975, Gilbert, 1976, Siebenlist, 1979). Innerhalb des transkribierten Bereichs findet man bei Prokaryonten die Shine-Dalgarno-Box (Shine & Dalgarno, 1974) mit der Sequenz T A A G G A G G in ihrer typischen Ausprägung. Die entsprechende Sequenz des Transkriptionsprodukts hybridisiert mit dem 3'-Ende der 16S-ribosomalen RNA und bringt so das erste translatierte Nukleotid-

A)



B)

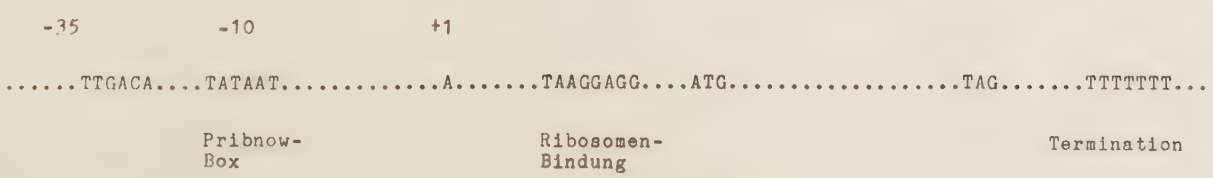


Abbildung 1: Idealtypische eukaryotische (A) bzw. prokaryotische (B) Transkriptionseinheit. In Anlehnung an Lewin (1980) und De Robertis & De Robertis (1980). Zur Erläuterung der Abbildung s. Text.

triplett A U G, das mit einem Abstand von etwa sieben Nukleotiden auf die Ribosomenbindungssequenz folgt, in seine Startposition am Ribosom. Das Ende der Translation wird durch ein oder mehrere hintereinandergeschaltete "Nonsense-Codons" (U A G, U A A, U G A) signalisiert, Transkriptionsstop dagegen durch die Folge von fünf bis neun Thymin-Resten, die auf GC-reiche DNA-Regionen folgen (z.B. Bertrand et al., 1975).

Die eukaryotische Transkriptionseinheit unterscheidet sich in einigen Punkten wesentlich von der der Prokaryonten. Das Prinzip der Colinearität auf allen Stufen der Genexpression, von der DNA bis zum Protein, das an Hand der prokaryotischen Systeme nachgewiesen wurde, wird bei der eukaryotischen Informationsübertragung durchbrochen: Im Laufe der eukaryotischen Genexpression wird eine "Precursor-RNA" transkribiert, die im Zellkern noch processiert wird, d.h. es werden Sequenzen, die sog. "intervening sequences", aus dem primären Transkript entfernt. Dieses RNA-"Splicing" beinhaltet Schneiden und Wiederverbinden der RNA-Kette an beiden Enden der "intervening sequence". An solchen Enden wurden häufig die Sequenzen A G G T A bzw. T X C A G gefunden (z.B. Breathnach et al., 1978).

Das 5'-Ende aller eukaryotischen messenger-RNAs ist mit einer methylierten "cap" versehen (z.B. Perry & Kelly, 1974), während das 3'-Ende eine Poly-(A)-Sequenz tragen kann (z.B. Edmonds et al., 1971). Diese Modifikationen, die nach der Transkription erfolgen, wurden häufig in Verbindung mit der Sequenz G T T G C T C C T X A C am 5'-Ende der transkribierten Region und der Sequenz A A T A A 25 Nukleotide vor dem letzten transkribierten Nukleotid am 3'-Ende gefunden (z.B. Konkel et al., 1978). Neben der Sequenz A A T A A steht vermutlich eine Folge von vier oder mehr Thymin-Resten in Zusammenhang mit der Polyadenylierung und der Termination der Transkription.

Die Promotorregion der Eukaryonten weist analog zur Pribnow-Box die sog. Hogness-Box mit der kanonischen Sequenz T A T A A A A auf (Gannon et al., 1979). Diese Sequenz liegt etwa 30 Nukleotide vor der "capping site". Eine Sequenz, die häufig die Folge G G $\frac{C}{T}$ C A A T C T aufweist und etwa 70 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart liegt, hat vermutlich eine der -35-Region der Prokaryonten analoge Funktion (Grosschedl & Birnstiel, 1980). Sie dient wahrscheinlich wie diese der besseren Erkennung der Promotorstruktur.

Weitere Analysen müssen zeigen, inwieweit die hier abgebildeten "idealtypischen" Strukturen repräsentativ sind, welche zusätzlichen Sequenzen an der Transkriptionsregulation beteiligt sind und in welcher Weise diese DNA-Regionen mit den betreffenden Proteinen interagieren. Die DNA-Struktur am Promotor z.B. bestimmt primär die Affinität der RNA-Polymerase zu dieser Sequenz sowie die Stabilität des DNA-Polymerase-Komplexes und damit die Stärke des Promotors, d.h. die Häufigkeit, mit der die Transkription initiiert werden kann. Die Parameter Affinität und Komplex-Stabilität werden aber durch eine Vielzahl von Faktoren moduliert, die für jedes System variieren können, wie am Beispiel der Promotornutzung des Phagen T4 im Kapitel 1.3. gezeigt werden soll.

1.2. Genexpression des Bakteriophagen T4

Bakteriophagen stellen die einfachsten Systeme zur Untersuchung der Genexpression dar. Nach der Infektion des bakteriellen Wirts durch virulente Bakteriophagen laufen zeitlich regulierte Vorgänge ab, die die Abschaltung des Wirtsmetabolismus, die Synthese viraler Genprodukte, die virale DNA-Replikation, die Verpackung der DNA in Hüllproteine und die Lyse der Bakterienzelle zur Folge haben. Die Regulation der Genexpression des Phagen

T4 betrifft sowohl die Transkription als auch die Translation: Translationsregulation wurde am Beispiel der Autoregulation der Genprodukte 32 und 43 nachgewiesen (Gold et al., 1976, Russel et al., 1976, Krisch et al., 1977), die Kodierung eigener tRNAs sowie das Binden phagenspezifischer Proteine an die Ribosomen (Smith & Haselkorn, 1969, Rahmsdorf et al., 1972) läßt ebenfalls auf posttranskriptionelle Regulation schließen.

Beim Phagen T4 ist jedoch die Regulation der Transkription von besonderer Bedeutung. Die Transkription der T4-DNA wird im gesamten Infektionsverlauf von der E.coli-RNA-Polymerase durchgeführt (Geiduschek & Sklar, 1969, Haselkorn et al., 1969). Die RNA-Polymerase besteht aus vier Untereinheiten, einer β'- (160 000 D), einer β- (150 000 D) und zwei α-Untereinheiten (je 36 500 D), die gemeinsam das sog. "core"-Enzym bilden. Die Initiation der Transkription erfolgt durch das sog. "holo"-Enzym, d.h. zusammen mit dem σ-Faktor (86 000 D; zur DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus E.coli s. Chamberlin, 1974).

Um die Gene des Phagen T4 ihrer Expression im Infektionsverlauf entsprechend zu charakterisieren, wurden zunächst zwei Hauptklassen unterschieden: frühe, präreplikative (early) und späte, postreplikative (true late) Gene. Die frühen Gene unterliegen jedoch keinem einheitlichen Regulationsprinzip und wurden dementsprechend weiter unterteilt. Zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit soll im folgenden eine kurze Charakterisierung der Genklassen des Phagen T4 vorgenommen werden. Es wurde die in der englischsprachigen Literatur übliche Nomenklatur der Genklassen übernommen, um nicht durch deutsche Übersetzungen die ohnehin schon herrschende begriffliche Unschärfe zu verstärken.

1. "Early Genes": Die frühen Gene des Phagen T4 werden bereits vor Beginn der DNA-Replikation, d.h. zwischen dreißig Sekunden und sechs Minuten nach Infektion transkribiert. Die Transkription erfolgt zu mehr als 99%

am sog. l-Strang der DNA (Notani, 1973), bezogen auf die zirkuläre genetische Karte des Virus gegen den Uhrzeigersinn. Zu den frühen Genprodukten gehören Proteine, die die Wirtsfunktionen abschalten oder verändern, Enzyme des DNA-Stoffwechsels, Membranproteine und Proteine mit phagenspezifischen Kontrollfunktionen sowie die T4-kodierten tRNAs. Frühe Gene wurden in zwei Regionen des T4-Genoms, zwischen 159 kb und 75 kb sowie zwischen 121 kb und 147 kb kartiert (vgl. Abb. 2).

"Immediate Early Genes": Dreißig Sekunden nach Infektionsbeginn können bereits die ersten T4-spezifischen Transkripte nachgewiesen werden, die sog. "immediate early" oder "preearly" RNAs (IE-RNA). Sie sind unabhängig von Proteinbiosynthese, d.h. unabhängig von T4-spezifischen Regulationsfaktoren. Der oben gegebenen Definition nach handelt es sich um typische frühe RNA. Zu den "immediate early" Genen gehören die Gene 30, 39, 52, 40, 41, 42, tRNA und die Gene der D-Region (Young et al., 1980).

"Delayed Early Genes":"Delayed early" RNA (DE-RNA) läßt sich nur methodisch definieren: Gibt man Chloramphenicol, einen Inhibitor der bakteriellen Proteinbiosynthese zu den Zellen, so wird nach T4-Infektion zwar "immediate early" RNA synthetisiert, die Transkription der Gene, die im normalen Infektionsverlauf nach etwa zwei Minuten initiiert wird, unterbleibt jedoch (Grasso & Buchanan, 1969, Salser et al., 1970). Diese Gruppe von Genen, zu denen die Gene rIIA, rIIB und 43 gehören (Young et al., 1980) und deren Transkription durch Chloramphenicol verhindert wird, wird als "delayed early" bezeichnet. Ihre Transkriptionsregulation ist allerdings nicht einheitlich (s. 1.3.).

"Anti Late RNA": Fünf Minuten nach Infektion ist etwa 2% der T4-spezifischen RNA komplementär zu später RNA ("true late" RNA). Diese sog. "anti late" RNA wird wie frühe RNA vom l-Strang abgelesen und zeigt Regulationsverhalten wie einige "delayed early" RNAs (Frederick & Snyder, 1977). Eine physiologische Funktion konnte ihr

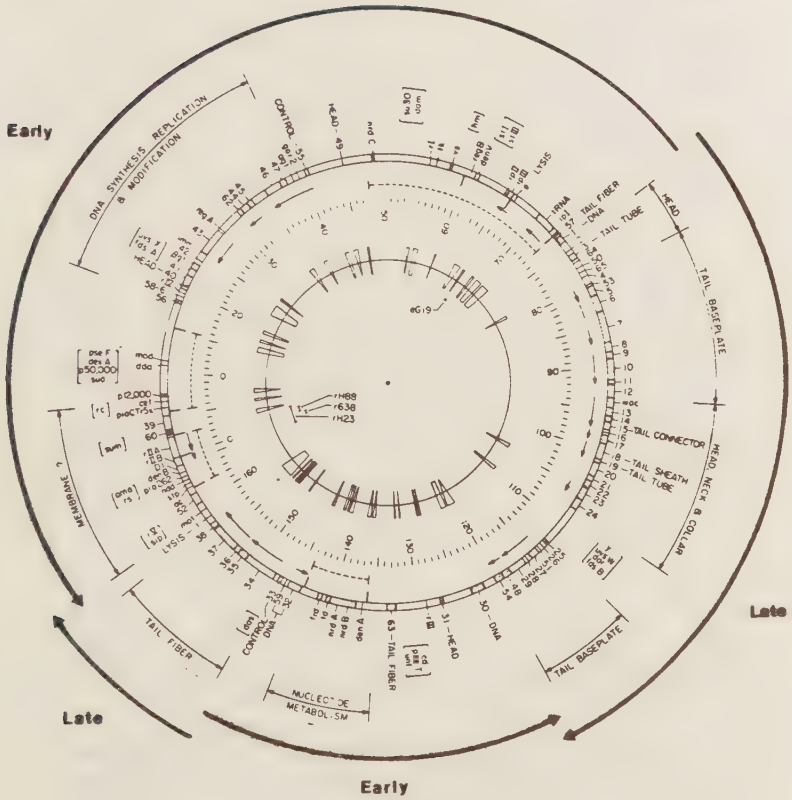


Abbildung 2: Genetische Karte des Bakteriophagen T4 (nach Wood & Revel, 1976). Die numerische Skala im Kreis gibt die Abstände der Gene zum genetischen Nullpunkt in kb an. Die äußeren Pfeile geben die Lage der frühen und späten Gene sowie die Transkriptionsrichtungen dieser Regionen an. Zur Bezeichnung und Charakterisierung der Gene vgl. Tabelle 11 (Anhang), Wood & Revel (1976) und Mosig (1980).

bislang nicht zugeordnet werden.

"Quasi Late" RNA: Viele Transkripte, z.B. die der Gene ipI, ipII, ipIII, tRNA und e, werden während des gesamten Infektionsverlaufs gebildet. Da ihre Synthese bereits vor der DNA-Replikation beginnt und am l-Strang der DNA erfolgt, sind es definitionsgemäß frühe RNAs. Bei einigen dieser Gene nimmt die Syntheserate zu späten Zeiten zu. Diese Gruppe wurde daher als "quasi late" bezeichnet (Salser et al., 1970).

2. "True Late Genes": Die späten Gene werden im Uhrzeigersinn vom sog. r-Strang der DNA abgelesen (Guha & Szybalski, 1968). Ihre Transkription beginnt erst nach Einsetzen der DNA-Replikation, zwischen acht und zehn Minuten nach Infektion, und setzt sich bis zur Lyse der Wirtszelle fort. Bei den späten Genprodukten handelt es sich vor allem um Strukturproteine: Kopf-, Hals-, Kragen-, Basisplatten- und Schwanzproteine. Späte Gene liegen zwischen 147 kb und 159 kb sowie zwischen 75 kb und 121 kb auf der genetischen Karte des Bakteriophagen T4 (vgl. Abb. 2).

1.3. Transkriptionsregulation des Bakteriophagen T4

Die Untersuchungen zur zeitabhängigen Transkription der DNA des Phagen T4 führten zwar zu einer Klassifizierung der Gene (s. 1.2.), aber nicht zu einer Aufklärung der Mechanismen, die der Regulation dieser Genexpression zugrunde liegen. Die bisher vorliegenden Forschungsergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß es drei unterschiedlich regulierte Promotorklassen gibt: die sog. frühen (P_E), mittleren (P_M) und späten (P_L) Promotoren (vgl. Rabussay & Geiduschek, 1977a und Abb. 3).

Frühe Promotoren werden unmittelbar nach Infektion durch den Bakteriophagen unabhängig von T4-spezifischen Faktoren von der RNA-Polymerase des Wirts erkannt.

Somit ermöglicht diese Promotorklasse die Transkription der "immediate early" Gene, die definitionsgemäß Proteinbiosynthese-unabhängig abgelesen werden (s. 1.2.). Untersuchungen von O'Farrell & Gold (1973a) zeigten jedoch, daß auch die Transkription einiger "delayed early" Gene an frühen Promotoren initiiert werden kann:

Zugabe von Rifampicin, einem Hemmstoff der Transkriptionsinitiation, zwei Minuten nach Infektionsbeginn, verhindert die Transkription einiger "delayed early" Gene, während andere als "delayed early" klassifizierte Gene auch in Gegenwart von Rifampicin abgelesen werden. Die Initiation der Transkription dieser Gene findet offenbar bereits vor Rifampicinzugabe statt. Da die diesen Genen entsprechenden RNAs jedoch nicht früher als zwei Minuten nach Infektionsbeginn nachgewiesen werden können, werden die betreffenden "delayed early" Gene vermutlich als promotordistaler Teil einer polycistronischen RNA abgelesen. Diese Transkriptionseinheiten werden also bereits vor der Rifampicinzugabe an frühen Promotoren initiiert, und es werden promotorproximale "immediate early" Gene abgelesen. Etwa zwei Minuten nach Infektionsbeginn werden durch Elongation der RNA ("read through") jedoch auch die "delayed early" Gene abgelesen, deren Transkription durch Rifampicinzugabe zu diesem Zeitpunkt nicht verhindert wird.

Die Gene, deren Transkription durch Rifampicinzugabe zwei Minuten nach Infektion unterbleibt, stehen offenbar unter der Kontrolle einer Promotorklasse, die nicht früher als zwei Minuten nach Infektionsbeginn erkannt wird: den mittleren Promotoren.

Da Chloramphenicol die Transkription aller "delayed early" Gene verhindert, wurde zunächst angenommen, daß T4-spezifische Proteine zur Synthese der "delayed early" RNA erforderlich sind. So wurde von Travers (1970) ein T4-spezifischer σ-Faktor postuliert. Frühe Transkription ist aber weitgehend unempfindlich gegenüber Aminosäureanaloga und solchen Antibiotika, die den Einbau anderer

als der von der DNA kodierten Aminosäuren in die Polypeptidkette ("miscoding") verursachen (Black & Gold, 1971 und Brody, 1975, Gold,1975, zitiert bei Rabussay & Geiduschek, 1977a). Nur Chloramphenicol und Puromycin, d.h. Antibiotika, die die Peptidyltransferase-Reaktion inhibieren, verhindern die Transkription aller "delayed early" Gene. Es wird daher vermutet (Young et al., 1980), daß der Einfluß von Chloramphenicol auf die frühe Transkription des Phagen T4 vor allem auf erhöhte Polarität zurückzuführen ist. Die frühe Transkription könnte einer der "Attenuation" (s. 1.1.) entsprechenden Terminationsregulation unterliegen. Die Entkopplung von Transkription und Translation durch die Zugabe von Chloramphenicol könnte eine Erhöhung der Terminationsrate an internen, der "Attenuation" unterliegenden Terminatoren zur Folge haben, so daß nur "immediate early", nicht aber "delayed early" Gene transkribiert werden (vgl. Rabussay & Geiduschek, 1977a, Young et al., 1980, Mattson et al., 1978). Die Transkription der frühen Gene wird etwa von dem Zeitpunkt an zunehmend unempfindlich gegenüber Chloramphenicol, zu dem auch die mittleren Promotoren erkannt werden.

Dieser Befund kann einerseits dahingehend interpretiert werden, daß Transkription, die an mittleren Promotoren initiiert wird, nicht dem durch Chloramphenicol bewirkten Terminationsmechanismus unterliegt. Andererseits könnte auch ein T4-spezifisches Antiterminationsprotein zu diesem Zeitpunkt die Chloramphenicol-abhängige Termination verhindern.

Das einzige T4-spezifische Protein, dessen Einfluß auf die Regulation der frühen Transkription des Phagen als gesichert angesehen werden kann, ist jedoch das *mot*-Genprodukt. Wird *E.coli* mit T4 *mot*-Mutanten infiziert, so werden die als "delayed early" klassifizierten Gene 43, 46, 32, 45 und rIIB gar nicht oder erst sehr spät im Infektionsverlauf transkribiert (Mattson et al., 1978). Diese Gene werden auch in den oben genannten Untersuchungen von O'Farrell & Gold (1973a) nach Zugabe von

Rifampicin zwei Minuten nach Infektion mit T4-Wildtypphagen nicht transkribiert. Daraus läßt sich zumindest für diese Gene ableiten, daß die Transkriptionsinitiation an mittleren Promotoren vom mot-Genprodukt abhängig ist.

Nach Einsetzen der DNA-Replikation werden späte Promotoren erkannt. Zur Transkriptionsinitiation an dieser dritten Promotorklasse werden sowohl die RNA-Polymerase aus E.coli als auch die T4-DNA in entsprechender Weise modifiziert:

1. Zur späten Transkription ist DNA-Replikation erforderlich. Es wird angenommen, daß Einzelstrangbrüche, wie sie in replizierender DNA auftreten, zur "true late" Transkription notwendig sind.

2. Die RNA-Polymerase wird schon vor Einsetzen der DNA-Replikation adenyliert und phosphoryliert. Durch das alt-Genprodukt des Phagen, das bereits im Phagenpartikel enthalten ist, werden ein Adenin und zwei Phosphatgruppen kovalent vor allem an die α-Untereinheit der RNA-Polymerase gebunden (Rohrer et al., 1975). Durch das T4 mod-Genprodukt wird zusätzlich ein spezifischer Argininrest der α-Untereinheit der RNA-Polymerase kovalent mit Adenosindiphosphoribose verbunden (Horvitz, 1974a und b). Beide Gene alt und mod sind an der "true late" Transkription beteiligt. Sie sind aber nicht essentiell für die Phagenentwicklung.

3. Die RNA-Polymerase, die aus T4-infizierten Zellen nach Einsetzen der DNA-Replikation isoliert wird, ist mit T4-spezifischen Proteinen assoziiert (Stevens, 1972, Wu et al., 1975, Sirotkin et al., 1977). Von diesen Proteinen sind die Genprodukte 33, 55 und 45 essentiell für die "true late" Transkription. Ein Wirkungsmechanismus ist jedoch nur für das alc-Genprodukt nachgewiesen: Das alc-Genprodukt ist dafür verantwortlich, daß nur an der Hydroxymethylcytosin enthaltenden DNA des Phagen und nicht an Cytosin enthaltender DNA transkribiert wird (Kutter et al., 1981).

Zusammenfassend läßt sich sagen: In den ersten neunzig Sekunden nach Infektion werden nur "immediate early" Gene abgelesen, deren Transkription an frühen Promotoren initiiert wird. Etwa zwei Minuten nach Infektionsbeginn gibt es ein oder mehrere regulatorische Ereignisse, in deren Folge die Spezifität der Transkriptionsinitiation und -termination verändert wird. "Delayed early" Gene werden zum einen als promotordistaler Teil polycistronischer RNAs, die an frühen Promotoren initiiert wurden, zum andern durch Transkriptionsinitiation an mittleren Promotoren abgelesen. Mit einsetzender DNA-Replikation ermöglichen Modifikationen der T4-DNA und der RNA-Polymerase die Transkription der "true late" Gene, die an späten Promotoren initiiert wird. Abbildung 3 zeigt Beispiele für diese regulatorischen Klassen der T4 Gene.

Welche T4-spezifischen Proteinfaktoren an dieser Transkriptionsregulation beteiligt sind, ist bislang noch nicht geklärt. Für die mittlere Transkription ist nur der Effekt des mot-Genprodukts nachgewiesen, für die späte Transkription sind die Genprodukte 33, 55 und 45 essentiell. Weitere Transkriptionsinitiations- bzw. -terminationsfaktoren wurden postuliert, aber nicht nachgewiesen. Ob die angegebenen Promotorklassen in sich einheitlich sind und inwieweit bestimmte Gene zu verschiedenen Zeiten nach Infektionsbeginn von unterschiedlichen Promotoren aus transkribiert werden, bedarf weitergehender Untersuchungen.

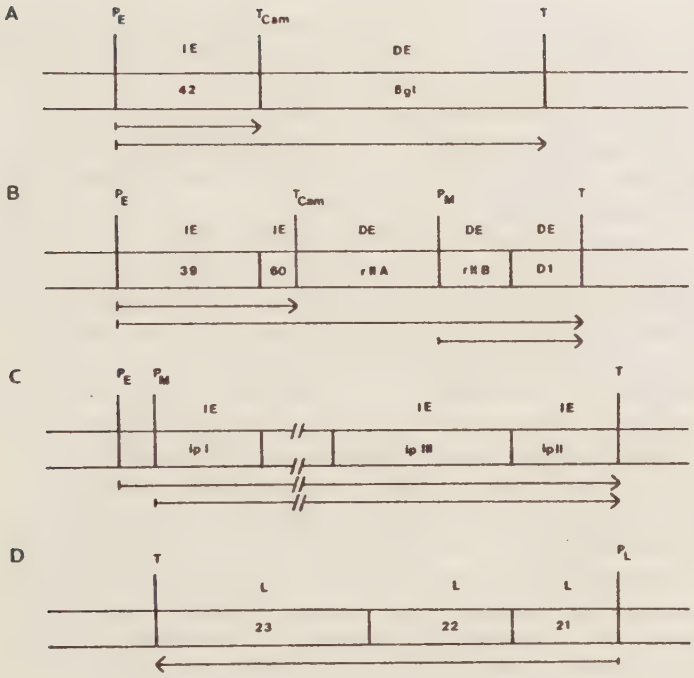


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Modellen zur Transkriptionsregulation des Phagen T4 (in Anlehnung an Rabussay & Geiduschek, 1977a). Die Transkription der "immediate early" Gene (IE), z.B. der Gene 42, 39 und ipI, wird an frühen Promotoren (P_E) initiiert (A, B, C). "Delayed early" Gene (DE), z.B. die Gene βgt und rIIA, können durch Elongation dieser Transkripte (A, B) oder, z.B. das Gen rIIB, nach Initiation an mittleren Promotoren (P_M) abgelesen werden (B). Mittlere Promotoren könnten zur Transkription früher Gene zu späten Zeiten, d.h. zur "quasi late" Transkription benutzt werden, was am Beispiel der Gene ipIII, ipII und ipI dargestellt ist (C). Späte, "true late" Transkription wird an späten Promotoren (P_L) initiiert (D). Die Beendigung der Transkription erfolgt an entsprechenden Terminatoren (T), in Gegenwart von Chloramphenicol auch an zusätzlichen internen Terminatoren (T_{Cam}) zwischen IE- und DE-Genen.

1.4. In vitro-Transkription der DNA des Phagen T4

Während in vivo die Transkription der T4-DNA eine Überlagerung verschiedener, noch ungeklärter Regulationseffekte zu sein scheint, bietet das in vitro-Transkriptionssystem den Vorteil der definierten Zusammensetzung der einzelnen Komponenten.

Gereinigte RNA-Polymerase aus nicht infizierten E.coli-Zellen transkribiert in Gegenwart von Ribonukleosidtriphosphaten als Substrat T4 Wildtyp-DNA in vitro. Die Transkriptionsprodukte können elektrophoretisch aufgetrennt werden und haben Kettenlängen von 450 bis 10 000 Nukleotiden (Rüger, 1978).

Es werden sowohl "immediate early" als auch "delayed early" Gene in vitro transkribiert (O'Farrell & Gold, 1973b), wobei vermutlich an frühen Promotoren (P_E) initiiert wird und die Transkription von "delayed early" Genen durch Elongation von "immediate early" Transkripten ("read through") erfolgt (vgl. 1.3.). Dafür spricht auch das zeitlich gegenüber der "immediate early" RNA verzögerte Erscheinen einiger "delayed early" RNA-Spezies in vivo wie in vitro (Milanesi et al., 1970, Jayaraman, 1972). Es wird daher angenommen, daß die in vitro-Transkription in Abwesenheit von Regulationsfaktoren bakteriellen wie viralen Ursprungs die frühe Transkription in vivo, die an frühen Promotoren (P_E) initiiert wird, imitiert.

Durch Zugabe entsprechender Lysate aus T4-infizierten Zellen wurden jedoch auch in vitro-Transkriptionssysteme entwickelt, die mittlere bzw. späte Transkription erlauben (Thermes et al., 1976, Rabussay & Geiduschek, 1977b).

Eine vergleichende Analyse solcher Systeme sowie die Untersuchung der entsprechenden Transkriptionsprodukte und der Orte ihrer Initiation, d.h. die Lokalisation früher, mittlerer und später Promotoren, kann zur Aufklärung der Regulation der Genexpression des Phagen T4 beitragen.

1.5. Problemstellung

Seit der Entwicklung von T4 alc-Mutanten, die mit Desoxycytosin-enthaltender DNA (dC-DNA) vermehrt werden können (Snyder et al., 1976), wurde damit begonnen, die Transkriptionsregulation des Bakteriophagen T4 mit Hilfe definierter Genomabschnitte in Form von Restriktionsfragmenten zu untersuchen. Restriktionsfragmente der T4 dC-DNA wurden in Phagen- oder Plasmid-DNA integriert, und die klonierte DNA wurde dem ihr entsprechenden Gen des Phagen zugeordnet. Die Transkription dieser Gene wurde dann durch Hybridisation T4-spezifischer RNA mit den klonierten Restriktionsfragmenten untersucht (Young et al., 1980). Mit Hilfe dieser Analysen konnten bereits einigen Genen des Phagen T4 in vivo synthetisierte RNAs zugeordnet werden, die auf Grund ihres zeitabhängigen Erscheinens im Infektionsverlauf, ihrer Kettenlänge und ihrer in vitro-Translationsprodukte charakterisiert worden waren (Young & Menard, 1981, Young et al., 1981).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls versucht werden, Transkriptionsprodukte der T4-DNA den ihnen entsprechenden Teilbereichen des Genoms zuzuordnen. Im Gegensatz zu den oben genannten Untersuchungen wurde jedoch zunächst nicht mit klonierten Genen des Phagen, sondern mit Restriktionsfragmenten der gesamten T4 dC-DNA gearbeitet.

Dazu sollte zunächst die physikalische Karte der durch Einwirken der Restriktionsendonuklease EcoRI auf T4 dC-DNA entstandenen Fragmente aufgestellt und mit der genetischen Karte des Phagen T4 korreliert werden. Mit Hilfe der so physikalisch wie genetisch definierten EcoRI-Restriktionsfragmente sollten frühe Transkriptionseinheiten der T4-DNA lokalisiert werden.

Diese Untersuchungen sollten als Grundlage zur Kartierung von T4-Promotoren dienen. Um nur eine regulatorische Klasse von Promotoren - frühe Promotoren -

anzusprechen, wurde als Untersuchungssystem die in vitro-Transkription der T4-DNA durch die nicht durch T4-spezifische Faktoren modifizierte RNA-Polymerase aus E.coli gewählt. Durch Hybridisation von in vitro synthetisierter RNA mit Restriktionsfragmenten der T4 dC-DNA und durch in vitro-Transkription an isolierten Restriktionsfragmenten sollte versucht werden, in vitro initiierbare Promotoren zu kartieren.

Zur Charakterisierung der Feinstruktur früher Promotoren des Phagen T4 sollte darüber hinaus versucht werden, eines der Restriktionsfragmente, an denen in vitro-Transkription initiiert werden kann, zu klonieren und die entsprechende Promotorregion durch DNA-Sequenzierung zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit sollte also versuchen, durch physikalische Kartierung und Untersuchungen zur in vitro-Transkription der T4-DNA einen Einblick in die molekulargenetische Organisation früher Transkriptionseinheiten des Bakteriophagen T4 zu gewinnen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt) und Baker (Gross Gerau) verwendet, Nukleotide, Nukleinsäuren und Enzyme von Boehringer (Mannheim) bezogen.

2.2. Bakterien- und Bakteriophagenstämme, Plasmide

Tabelle 1 gibt die verwendeten Bakterien- und Bakteriophagenstämme sowie Plasmide an.

2.3. Vermehrung von Bakteriophagen und Isolation von Bakteriophagen- und Plasmid-DNA

2.3.1. Nährmedien und Puffer zur DNA-Isolation

PAGFe-Medium:
- 50 mM Na_2HPO_4
- 22 mM KH_2PO_4
- 18,6 mM NH_4Cl
- 2,1 mM $MgSO_4$
- 27,5 mM Glucose
- 0,01 mM $FeCl_3$

TBY-Medium:
- 10 g Bacto-Trypton (Difco)
- 5 g Hefe-Extrakt (Difco)
- 5 g NaCl

Selektivmedien:
- 100 µg/ml Ampicillin (Sigma)
- 10 µg/ml Tetracyclin (Sigma)

Tabelle 1: Bakterien- und Bakteriophagenstämme, Plasmide

Stamm	relevanter Genotyp	Bezugsnachweis
E.coli BA	Wildtyp	Stammsammlung d. Arbeitsgruppe
E.coli B834	gal⁻(U56)(met⁻, gal⁻(U), su⁻) r_B^- m_B^-	L. Snyder, East Lansing
E.coli CR63	su_1^+	Stammsammlung d. Arbeitsgruppe
E.coli W3110	λ, cI857, Sam7	W. Wackernagel, Bochum
E.coli C600	thr-1, leu-6, thi-1, supE44, lacY1, tonA21	R. Eichenlaub, Bochum
T4	Wildtyp	Stammsammlung d. Arbeitsgruppe
T4 "rIIH23"	56⁻(amE51)-denA⁻(nd28)-denB⁻("rIIH23")-alc⁻(alc8)	L. Snyder, East Lansing
T4 alc536	56⁻(amE51)-denA⁻(amC87)-denB⁻(S19)-alc⁻(unf39)	E. Kutter, Olympia
T4 saΔ9	56⁻(amE51)-42⁻(amN55)-denA⁻(nd28)-denB⁻(saΔ9)	T. Mattson, Genf
T5 st0	st0	H. Bujard, Heidelberg
fd	Wildtyp	Stammsammlung d. Arbeitsgruppe
λΦ607	imm^{434}	R. Eichenlaub, Bochum
pBR322	Tc^r, Ap^r	R. Eichenlaub, Bochum
pEN88	diese Arbeit	

WF:

10 mM Tris HCl pH 7,4
1 mM $MgCl_2$
20 mM NaCl

20xSSC:

3 M NaCl
0,3 M Trinatriumcitrat

Phosphatpuffer:

39,3 mM Na_2HPO_4
40,2 mM KH_2PO_4
68,4 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$

TES:

100 mM Tris HCl pH 7,5
50 mM NaCl
5 mM EDTA

Triton-Lytic-Mix (Kupersztoch-Portnoy et al., 1974):

50 mM Tris HCl pH 7,5
62,5 mM EDTA
0,4 % Triton X100

Sucrose-Tris-Lysozym-Lösung:

20 % Sucrose
40 mM Tris HCl pH 8
1 mg/ml Lysozym

TE:

10 mM Tris HCl pH 8
0,1 mM EDTA

2.3.2. Isolation von T4 Wildtyp-DNA (Thomas & Abelson, 1960)

Eine logarithmisch wachsende Kultur von E.coli BA in PAGFe-Medium wurde bei einer Zelldichte von $5x10^8$/ml in Gegenwart von 5 µg/ml Tryptophan mit T4 Wildtypphagen mit einer Infektionsmultiplizität von 0,1 infiziert und bis zur Zellysis unter starker Belüftung bei 37°C gehalten. Das Phagenlysat wurde durch kurze, niedertourige Zentrifugation von Zelltrümmern gereinigt, bakterielle DNA wurde durch Zugabe von 1 µg/ml DNAse I hydrolysiert. Die Phagenpartikel wurden durch eine zweistündige Zentrifugation bei 23 000 x g sedimentiert und über Nacht in WF resuspendiert. Zur Reinigung von bakteriellen Proteinen und Nukleinsäuren wurde eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt: ein vorgeformter Stufengradient mit 1 ml gesättigter und je 2 ml 1:1 bzw. 1:4 verdünnter CsCl-Lösung wurde mit einer $1x10^{11}$ Phagen pro ml enthaltenden Phagensuspension überschichtet. Nach 3 h Zentrifugation bei 15°C und 33 000 rpm im Beckman-SW 40-Rotor wurde der Gradient abgetropft, und die die Phagen enthaltende Fraktion wurde gegen 0,01 x SSC dialysiert. Die DNA wurde durch dreimalige Phenolextraktion aus den Phagenpartikeln isoliert und anschließend dreimal 4 h gegen 0,25 M NaCl, 0,01 M Tris HCl pH 7,9, 0,01 M EDTA und dreimal 12 h gegen 0,01 M Tris HCl pH 7,4, 0,01 M NaCl, 1 mM EDTA dialysiert. DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.3.3. Isolation von T4 alc-DNA (Snyder et al., 1976)

10 ml TBY-Medium wurden mit 0,3 ml einer E.coli B834 Übernachtkultur und einem Einzelplaque der entsprechenden alc-Mutante angeimpft und 6 h bei 37°C be-

brütet. Die Zellysis wurde durch Chloroform-Zugabe unterstützt. Mit diesem Rohlysat wurden 100 ml E.coli B834 in TBY-Medium bei einer Zelldichte von $2x10^8$/ml infiziert, so daß die Phagenkonzentration $6x10^7$/ml betrug. Nach 6 h bei 37°C wurden die Konzentrierung der Phagen sowie die Reinigung, Phenolextraktion und Dialyse der DNA wie unter 2.3.2. beschrieben durchgeführt.

2.3.4. Isolation von T4 saΔ9-DNA (Mattson et al., 1977)

Zur Vermehrung der T4 saΔ9-Phagen wurde eine logarithmisch wachsende Kultur von E.coli CR63 in PAGFe-Medium bei einer Zelldichte von $3x10^8$/ml in Gegenwart von 5 µg/ml Tryptophan mit T4 saΔ9-Phagen mit einer Infektionsmultiplizität von 5 infiziert und bei Raumtemperatur mindestens 6 h lang bebrütet. Die Konzentrierung der Phagen erfolgte wie unter 2.3.2. beschrieben. Zur Isolation von T4 dC-DNA wurde E.coli BA in PAGFe-Medium bei einer Zelldichte von $4x10^8$/ml nach Zugabe von 5 µg/ml Tryptophan mit T4 saΔ9-Phagen mit einer Infektionsmultiplizität von 10 infiziert. Nach 60 min bei 37°C wurden die Zellen auf 0°C abgekühlt, durch eine kurze, niedertourige Zentrifugation sedimentiert, in $\frac{1}{50}$ Volumen PAGFe-Medium mit 50 mM EDTA resuspendiert und durch Lysozym-SDS-Behandlung lysiert: Nach Zugabe von 300 µg/ml Lysozym (Serva) wurde die Suspension zunächst 5 min, nach Zugabe von SDS (0,5% Endkonzentration) weitere 5 min bei 37°C gehalten. Die anschließende viermalige Phenolextraktion und Dialyse der DNA wurden wie unter 2.3.2. beschrieben durchgeführt.

2.3.5. Nachweis weiterer Bakteriophagenstämme

Die DNA der Phagen T5 st0, λ cI857 Sam7 und λΦ607 wurde nach Standardmethoden isoliert (Bujard & Hendrickson, 1973, Landy et al., 1974, Murray et al., 1977, Murray & Murray, 1979). Die DNA des Phagen fd (replikative Form)

wurde von I.W.Green (Bochum) zur Verfügung gestellt.

2.3.6. Isolation von Plasmid-DNA

Der das entsprechende Plasmid enthaltende E.coli C600-Stamm wurde als 2 l TBY-Kultur bei 37°C bis zu einer Zelldichte von $4x10^8$/ml vermehrt. Nach Zugabe von 250 µg/ml Chloramphenicol (Sigma) wurde die Bakterienkultur zur Amplifikation der Plasmid-DNA (Clewell, 1972) 15 h lang bei 37°C bebrütet. Die Zellen wurden dann durch kurze, niedertourige Zentrifugation sedimentiert und in 16 ml TES resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch zunächst 20minütige Inkubation bei 0°C in Gegenwart von 25 mM EDTA und 1 mg/ml Lysozym und anschließende 10minütige Inkubation bei 0°C nach Zugabe von 20 ml Lytic-Mix (Katz et al., 1973, Lovett & Helinski, 1976). Durch einstündige Zentrifugation bei 48 000 x g wurden Zelltrümmer und ein großer Teil chromosomaler DNA sedimentiert. Zu je 3,8 ml Überstand wurden 1 mg Ethidiumbromid (Sigma) und 3,6 g CsCl gegeben, was einer Dichte von 1,55 g/cm^3 entspricht. Nach Zentrifugation für 16 h bei 200 000 x g im Beckman VTi50-Rotor lassen sich auf Grund des interkalierenden Ethidiumbromids chromosomale und Plasmid-DNA im UV-Licht sichtbar machen. Durch Abtropfen des Gradienten wurde die dichtere Bande, die die Plasmid-DNA enthält, gewonnen. Das Ethidiumbromid wurde durch dreimalige Extraktion mit wassergesättigtem Butanol entfernt. Die DNA wurde 2 mal 12 h gegen TES dialysiert und anschließend mit Äthanol gefällt.

2.4. Äthanolfällung von DNA

DNA-Lösungen wurden mit 3 M Natriumacetat auf 0,3 M Natriumacetat gebracht, Lösungen mit weniger als 1 µg/ml DNA zusätzlich auf 5 bis 10 mM $MgCl_2$. Zur Fällung von weniger als 350 µl DNA-Lösung wurden 3 Volumina absoluten Äthanols zu der DNA in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Lösung wurde 10 min bei -70°C (Äthanol-Trockeneisbad) gehalten, und die DNA wurde durch 10 min Zentrifugation bei 9980 x g (Eppendorf-Zentrifuge Typ 5412) sedimentiert. Größere DNA-Mengen wurden mit 2 Volumina absoluten Äthanols versetzt, mindestens 2 h bei -20°C gehalten und anschließend im Sorwall-HB4-Rotor bei 10 000 x g und -20°C 30 min lang sedimentiert. DNA-Sedimente wurden zweimal mit 80% Äthanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

2.5. Gel-Elektrophorese

Wenn nicht anders angegeben, wurden 12 x 15 x 0,5 cm Agarosegele, 12 x 15 x 0,15 cm Polyacrylamid-Agarosegele zur Auftrennung von in vitro-Transkriptionsprodukten oder 40 x 20 x 0,15 cm Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophoresen wurden in vertikalen Plattengel-Apparaturen durchgeführt (Studier, 1973). Die Spannungsangaben im Text beziehen sich auf die oben aufgeführten Gellängen von 12 bzw. 40 cm.

2.5.1. Lösungen zur Gel-Elektrophorese

10 x TBE (Peacock & Dingman, 1968):

892 mM Tris
25 mM EDTA
890 mM Borsäure
(pH 8,3)

20 x G:

0,8 M Tris
0,04 M EDTA
0,8 M Natriumacetat
0,2 % SDS
(pH 7,0)

DNA-Stoppuffer:

50 % Glycerin
0,05 M EDTA
0,5 % SDS
je 20 µg/ml Bromphenolblau (Serva), Xylencyanolblau (Serva), Orange G (Serva)

RNA-Stoppuffer:

50 % Glycerin
0,2 M EDTA
20 µg/ml Bromphenolblau

Ethidiumbromidlösung:

5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma)

DMSO-Lösung:

30 % DMSO (Ega-Chemie)
1 mM EDTA
je 20 µg/ml Bromphenolblau, Xylencyanolblau, Orange G

Formamid-Farbmarker:

70 % Formamid
je 20 µg/ml Bromphenolblau, Xylencyanolblau, Orange G

Strangtrennungsgel-Lösung:

5 % Acrylamid (Serva)
0,1 % N,N'-Methylenbisacrylamid (Serva)
$\frac{1}{2}$ x TBE

30% Acrylamid-Stammlösung:

29 % Acrylamid
1 % N,N'-Methylenbisacrylamid
in H_2O

20 %-Sequenzgel-Lösung:

600 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung
378,4 g Harnstoff
45 ml 10 x TBE

10 %-Sequenzgel-Lösung:

300 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung
378,4 g Harnstoff
45 ml 10 x TBE
300 ml H_2O

6 %-Acrylamidgel-Lösung:

24 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung
6 ml 10 x TBE
90 ml H_2O

2.5.2. DNA-Agarosegele

Agarosegele mit Konzentrationen kleiner als 0,5% wurden mit Agarose der Firma Biorad hergestellt. In der Regel wurde Agarose (Typ II) der Firma Sigma benutzt. Niedrigschmelzende Agarose ("Seaplaque", s.2.6.3.) wurde bei Marine Kolloids bezogen. Gel- bzw. Elektrophoresepuffer war 1 x TBE. DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit $\frac{1}{10}$ Volumen DNA-Stoppuffer versetzt, die DNA wurde bei einer Spannung von 90 V (≙ 50 mA) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend mit Ethidiumbromidlösung behandelt. Die angefärbten Banden wurden über UV-Licht (Chromatovue Transilluminator Typ C-22, UV-Products Inc.) sichtbar gemacht und durch Rot-Orange-Filter (Hoya, R (25A)) auf Ilford-Pan F-Film fotografiert.

2.5.3. RNA-Gele (Summers et al., 1973)

Zur Auftrennung von in vitro-Transkriptionsprodukten wurden gemischte Gele mit 0,5% Agarose (Indubiose A 37, L'Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers), 3% Acrylamid (Serva) und 0,125% N,N'-Methylenbisacrylamid (Serva) verwendet. Gel- bzw. Elektrophoresepuffer war 1 x G. Die Polymerisation der Gele erfolgte nach Zugabe von 35 mg Ammoniumpersulfat (Serva) und 35 µl TEMED (Fluka) pro 30 ml Gellösung. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen RNA-Stoppuffer versetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf Whatman-3MM-Papier aufgetrocknet (Reid & Bielinski, 1968) und zur Autoradiographie mit Structurix FW, D7P-Röntgenfilm (Agfa-Gevaert, Belgien) exponiert.

2.5.4. Polyacrylamidgele

Native DNA-Polyacrylamidgele wurden vor Gebrauch, wie unter 2.5.1. angegeben, aus den entsprechenden Stammlösungen zusammengegeben. Die aufgeführten Strangtrennungs- und Sequenzgel-Lösungen sind Gebrauchslösungen. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von 0,6 mg/ml Ammoniumpersulfat (Serva) und 1 µl/ml TEMED (Fluka) gestartet. Gel- bzw. Elektrophoresepuffer war $\frac{1}{2}$ x TBE.

2.5.4.1. Native DNA-Polyacrylamidgele

Die polymerisierten Gele wurden 30 min bei 500 V vorelektrophoretisiert. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen Stoppuffer versetzt und bei einer Spannung von 500 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele entweder mit Ethidiumbromid angefärbt (s.2.5.2.) oder mit Klarsichtfolie abgedeckt und zur Autoradiographie mit Kodak X Omat XR5-Röntgenfilm exponiert.

2.5.4.2. DNA-Strangtrennung in Polyacrylamidgelen

Zur Strangtrennung von radioaktiv markierten Restriktionsfragmenten bis zu einer Kettenlänge von etwa 400 bp wurde die salzfreie DNA, dem Protokoll bei Maxam & Gilbert (1980) entsprechend, in 40 µl DMSO-Lösung gelöst, zur Denaturierung 2 min bei 90°C gehalten, auf 0°C abgekühlt und auf ein 30 min bei 300 V vorelektrophoretisiertes Strangtrennungsgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 300 V durchgeführt, die DNA wurde durch Autoradiographie nachgewiesen.

2.5.4.3. Sequenzgele

Die polymerisierten Harnstoffgele wurden 30 min bei 800 V vorelektrophoretisiert, nachdem die Probentaschen des Gels mit 7 M Harnstoff gefüllt worden waren. Die DNA-Sequenzproben wurden nach dem letzten Lyophilisationsschritt (s.2.13.) in 15 µl Formamidfarbmarker gelöst und zur Denaturierung 2 min bei 100°C gehalten, in Eiswasser abgekühlt und, nach Entfernen des Harnstoffs aus den Probentaschen, auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 1000 V, der Nachweis der DNA autoradiographisch.

2.6. Isolation von DNA aus Gelen

2.6.1. Diffusionsmethode für Agarosegele (modifiziert nach Kaplan et al., 1977)

DNA-haltige Agarosestreifen wurden durch eine Kanüle gepreßt, mit 2 Volumina Puffer (0,01 M Tris HCl pH 8, 0,25 M NaCl, 0,1 mM EDTA) vermischt und im Dunkeln 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Agarose zunächst durch Filtration über silikonisierte Glas-

wolle abgetrennt, restliche Agarose wurde dann durch dreimalige Phenolextraktion entfernt. Phenolreste wurden mit Diäthyläther extrahiert, die DNA wurde durch Äthanolfällung konzentriert.

2.6.2. Diffusionsmethode für Polyacrylamidgele

DNA-haltige Polyacrylamidgelstreifen wurden mit Hilfe eines mit Parafilm umwickelten Glasstabs in einem Polypropylenröhrchen zermörsert und nach Zugabe von 2 Volumina TE-Puffer (s.2.3.1.) 16 h bei 55°C inkubiert. Polyacrylamid wurde durch Filtration über silikonisierte Glaswolle abgetrennt. Das Eluat wurde 5 min bei 9980 x g zentrifugiert, und die DNA im acrylamidfreien Überstand wurde durch Äthanolfällung konzentriert.

2.6.3. DNA-Isolation aus niedrigschmelzender Agarose (Kuhn et al., 1979)

DNA-haltige Seaplaque-Agarosegelstreifen wurden zum Schmelzen der Agarose 60 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 Volumina Puffer (0,05 M Tris HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA) wurde die Suspension 10 min bei 37°C gehalten. Anschließend wurde die Agarose durch dreimalige Phenolextraktion entfernt. Die Phenolreste wurden mit Diäthyläther extrahiert, und die DNA wurde durch Äthanolfällung konzentriert.

2.6.4. Elektroelution (McDonnell et al., 1977)

DNA-haltige Agarose- oder Polyacrylamidgelstreifen wurden mit 2 Volumina 1 x TBE in Dialyseschläuche gegeben. Die Dialyseschläuche wurden mit Klammern (Reichelt) verschlossen und so in eine mit 1 x TBE gefüllte Elektro-

phoresekammer gelegt, daß sich nach Anlegen von 300 V (≙ 100 mA) die DNA im gelfreien, pufferhaltigen Innenraum des Dialyseschlauchs sammeln konnte. Nach 1 bis 2 h Elektrophorese wurde für 2 min umgepolt, um DNA von dem Dialyseschlauch abzulösen. Die DNA-Lösung wurde anschließend dreimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und durch Äthanolfällung konzentriert.

2.7. Isolation und Jodierung von RNA

Die Isolation von in vivo-RNA aus T4-infizierten E.coli BA-Zellen erfolgte wie bei Bautz & Hall (1962) beschrieben. Zur radioaktiven Markierung der RNA wurde der Wasserstoff des C5-Atoms des Cytosin durch ^{125}J ersetzt (Commerford, 1971):

Der Reaktionsansatz enthielt in 100 µl Gesamtvolumen 10 µg gereinigt RNA, 0,045 M Natriumacetat pH 4,9, 0,01 mM KJ, 424 µCi $Na^{125}J$ (NEN, 500 Ci/ml, trägerfrei in wässriger Lösung) und 11,5 µg $TlCl_3$. Nach 15minütiger Inkubation bei 70°C wurden die Proben zur Stabilisierung der entstandenen Jodocytosinbindungen 20 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 200 µl 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 und anschließender 45minütiger Inkubation bei 60°C zur Destabilisierung von Nebenprodukten wurde der Reaktionsansatz mit 0,5 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,0 verdünnt, und die jodierte RNA wurde durch Hydroxylapatit-Chromatographie (Mazin et al., 1974) von freiem $Na^{125}J$ gereinigt: Die Säule wurde mit 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 bei Raumtemperatur gewaschen, die Elution der RNA erfolgte bei 70°C mit 0,3 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8.

Die RNA wurde zweimal 12 h gegen 0,025 M Tris HCl pH 7,6, 0,3 M NaCl, 0,01 M EDTA und 0,1% SDS dialysiert, anschließend mit 2 Volumina Äthanol versetzt und zur Fällung länger als 2 h bei -20°C gehalten. Die Nukleinsäure wurde bei 10 000 x g sedimentiert, getrocknet, in 0,15 M

Natriumacetat pH 6,0, 0,5% SDS resuspendiert und erneut mit Äthanol gefällt. Die spezifische Aktivität betrug etwa $5x10^6$ cpm/ µg RNA.

2.8. Restriktion

Die Restriktionsendonukleasen XhoI und BglII wurden in der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik (Bochum) isoliert (Rüger et al., 1979, Kiko et al., 1979). KpnI wurde freundlicherweise von Dr. W. Büttner (Bochum) zur Verfügung gestellt. XbaI und HaeII wurden von BRL (Rockville), alle anderen Restriktionsendonukleasen von Boehringer (Mannheim) bezogen.

Mit Ausnahme von SmaI (25°C) wurden Restriktionsansätze bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Reaktion wurde durch 10minütiges Erhitzen auf 70°C abgestoppt.

2.9. In vitro-Transkription (Rüger, 1978)

Transkriptionsansätze enthielten in 50 µl 2,5 µg T4 Wildtyp-DNA bzw. 0,2 µg Restriktionsfragment, 0,6 µg RNA-Polymerase aus E.coli, je 0,5 mM GTP, CTP und UTP, 0,05 mM ^{14}C ATP (Amersham Buchler, 500 Ci/mM, trägerfrei in wässriger Lösung), 0,2 M NaCl, 0,04 M Tris HCl pH 8,0, 0,01 M $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM DTT. Die Synthese wurde 30 min bei 37°C durchgeführt.

Dinukleotidelongationsansätze wurden zunächst ohne unmarkierte Ribonukleosidtriphosphate in Gegenwart von 0,5 mM UpC (Pharma Waldhof) und 0,05 mM ^{14}C UTP (Amersham Buchler, 500 Ci/mM, trägerfrei in wässriger Lösung) 10 min bei 37°C zur Initiation inkubiert. Polyinosinsäure wurde zur Kompetition bis zu einer Konzentration von 0,2 mg/ml zugegeben, und die Ansätze wurden weiter 10 min bei 37°C, anschließend 30 min bei 0°C gehalten. Nach Zugabe der

Tabelle 2: Restriktionsbedingungen

Restriktions-enzym	Tris HCl (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)	$MgCl_2$ (mM)	DTT (Sigma) (mM)	βMercapto-äthanol (mM)	BSA (Merck) (µg/ml)	pH
BamHI	6	-	20	6	6	-	-	7,5
BglII	10	-	6	10	1	-	-	7,5
ClaI	10	-	-	10	-	-	-	8,0
EcoRI	100	50	-	10	-	-	-	7,5
HaeII	6	-	-	6	-	6	100	7,5
HindIII	10	50	-	10	14	-	-	7,5
HinfI	10	50	-	10	10	-	-	7,5
HpaII	10	-	-	10	1	-	-	7,5
KpnI	6	6	-	6	-	6	100	7,5
SalI	6	150	-	6	6	-	-	8,0
SmaI	15	-	15	6	-	-	-	8,5
XbaI	6	150	-	6	-	6	-	8,0
XhoI	6	150	-	6	-	6	-	8,0

fehlenden Ribonukleosidtriphosphate (s.o.) wurden die unter diesen Bedingungen initiierten Transkripte in 30 min bei 37°C zu Ende synthetisiert.

Die Syntheserate wurde mit Hilfe eines Filtertests (Blatti et al., 1970) überprüft. Die Transkripte wurden elektrophoretisch aufgetrennt bzw. zur Hybridisation eingesetzt.

2.10. Southern-Transfer und Hybridisation (modifiziert nach Southern, 1975)

DNA-Moleküle mit einem Molekulargewicht über $10x10^6$ D werden mit geringerer Effizienz transferiert als kleinere Moleküle (Southern, 1975). Die DNA wurde daher im Agarosegel durch Säurebehandlung partiell depuriniert. Die anschließende Alkalibehandlung zur Denaturierung der DNA führt zu Strangbrüchen an den Depurinierungsstellen, so daß Moleküle mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 1 bis 2 kb entstehen (Wahl et al., 1979).

Zur Durchführung wurde das Gel zweimal 15 min in 0,25 M HCl gegeben. Die Säure wurde mit H_2O abgespült, und das Gel wurde zur Alkali-Denaturierung der DNA zweimal 15 min in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl gegeben. Das Gel wurde erneut mit H_2O abgespült und zur Neutralisation zweimal 30 min in 0,5 M Tris HCl pH 7,2, 3 M NaCl gegeben.

Zum Transfer der einzelsträngigen DNA wurde eine mit Whatman 3MM-Papier umwickelte Glasscheibe auf kleine Sockel in eine Schale gelegt, deren Boden mit 6 x SSC (s.2.3.2.) bedeckt war. Das Gel wurde auf das puffergetränkte Chromatographiepapier gegeben, und die Gelränder wurden mit Klarsichtfolie abgedeckt. Ein mit 6 x SSC durchfeuchteter Nitrozellulosefilter (Sartorius, Typ SM 11378, 0,15 µm Porengröße) wurde auf das Gel gelegt, und puffergetränktes sowie trockenes Whatman 3MM-Papier, ein Stapel saugfähiges Papier und eine Glasplatte mit einem

500 g-Gewicht wurden auf den Filter gegeben. Nach 1 h wurde das saugfähige Papier durch frisches ersetzt. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht. Anschließend wurde der Nitrozellulosefilter 20 min in 2 x SSC gewaschen und länger als 2 h bei 80°C und 1 atm Unterdruck getrocknet.

Hybridisation zwischen RNA und an Filter gebundener DNA wurde ohne weitere Vorbehandlung des Nitrozellulosefilters durchgeführt.

Nitrozellulosefilter zur DNA:DNA-Hybridisation wurden dagegen erst durch Prähybridisation mit Polymeren abgesättigt, um unspezifische Hybridisation zu verhindern. Dazu wurde der Filter 4 h bei 65°C in Gegenwart von 4 x SSC, 5 x Denhardt's Reagenz (Denhardt, 1966), 1% Glycin, 250 µg/ml denaturierter, beschallter Kalbsthymus-DNA (Serva), 50% Formamid und 1% SDS inkubiert (Wahl et al., 1979).

Zur Hybridisation wurde der Filter zwischen zwei silikonisierte Glasplatten gelegt. Ein dünner Silikonschlauch wurde zwischen den Glasplatten an drei Seiten um den Filter gelegt, so daß nach Zusammenklammern der Platten eine etwa 2 ml fassende Hybridisationskammer entstand. DNA:RNA-Hybridisationen wurden in 4 x SSC, 0,1% SDS bei 70°C durchgeführt; DNA:DNA-Hybridisationen wurden in Gegenwart von 4 x SSC, 5 x Denhardt's Reagenz (s.o.), 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA (s.o.), 50% Formamid und 0,1% SDS bei 42°C durchgeführt. Radioaktiv markierte RNA bzw. radioaktive, denaturierte DNA wurden im Unterschuß zugegeben. Die Hybridisationszeit betrug 16 h.

Die Filter wurden anschließend dreimal 20 min in 4 x SSC, 0,1% SDS bzw. in 4 x SSC, 50% Formamid, 0,1% SDS bei Hybridisationstemperatur und dreimal 20 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur gewaschen, 30 min bei 65°C getrocknet und zur Autoradiographie mit Kodak X Omat XR5-Röntgenfilm exponiert.

2.11. Klonierung

2.11.1. In vitro-Rekombination von Nukleinsäuren (Ligation) (modifiziert nach Dugaiczyk et al., 1975)

T4-induzierte Ligase ist in der Lage, in einer ATP-abhängigen Reaktion doppelsträngige DNA-Fragmente zu verbinden. Zur Klonierung wurden sowohl die Vektor-DNA als auch die zu klonierende T4-DNA mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten, die Nuklease wurde inaktiviert (s.2.8.), und die entstandenen Fragmente wurden zur Ligation eingesetzt.

Um Ligation der Vektor-DNA-Moleküle untereinander zu verhindern, wurde die restringierte pBR322-DNA an den jeweiligen 5'-Enden dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung und anschließende Proteasebehandlung wurden wie unter 2.12.2. beschrieben durchgeführt.

Ligationsansätze enthielten in 100 µl Endvolumen 2,5 µg Vektor-DNA und 5 µg T4 dC-DNA bzw. 1,5 µg eines isolierten T4-Restriktionsfragments, 5 bis 50 mM Tris HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT und 0,3 mM ATP. Die Ansätze wurden mit 1 µl Ligase (T4-induzierte DNA-Ligase wurde freundlicherweise von Dr. R. Eichenlaub zur Verfügung gestellt) 16 h bei 15°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Die DNA wurde in Gegenwart von 10 µg tRNA mit Äthanol gefällt und in 50 µl Puffer (10 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) resuspendiert.

2.11.2. Transformation von E.coli C600 (modifiziert nach Cohen et al., 1972)

Zur Transformation wurden E.coli C600-Zellen bei einer Zelldichte von $4x10^8$/ml aus 20 ml TBY-Medium durch kurze, niedertourige Zentrifugation sedimentiert, mit 10 ml eiskaltem 10 mM NaCl gewaschen, erneut sedimentiert und in 10 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert. Die Zellen

wurden 20 min auf Eis gehalten, erneut sedimentiert, in 2 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und 1 h auf Eis gehalten. 50 µl dieser Zellsuspension, 50 µl ligierte DNA (s.2.11.1.) und 100 µl 0,1 M $CaCl_2$ wurden zur Transformation der Zellen zusammengegeben und 1 h bei 0°C inkubiert. Die Transformation wurde durch 3minütiges Erhitzen auf 42°C beendet, die Zellen mit 2,5 ml TBY-Medium verdünnt und je nach verwandtem Vektor weiter behandelt.

2.11.3. Klonanalyse mit λφ607

Die DNA des Phagen λφ607 trägt nur eine EcoRI-Schnittstelle, die im cI-Gen des Phagen liegt. Wird in diese Schnittstelle ein zusätzliches EcoRI-Fragment integriert, so verliert der Phage die Fähigkeit zu lysogenisieren, was sich als Klarplaque-Phänotyp ausprägt. Dieser Klarplaque-Phänotyp kann daher zur Selektion von Hybridphagen verwendet werden.

E.coli C600-Zellen, die mit in vitro mit T4 dC-DNA rekombinierter λφ607-DNA transformiert worden waren, wurden zur Isolation von Klarplaque-bildenden Hybridphagen auf TBY-Agarplatten ausgeplattet und über Nacht bebrütet (30°C). Zur Klonanalyse wurden Klarplaques ausgestochen und in 1 ml Phosphatpuffer (s.2.3.1.) resuspendiert. Ausgehend von dieser Phagensuspension wurden die Hybridphagen vermehrt (Murray et al., 1977, Murray & Murray, 1979). Die Phagen wurden durch zweistündige Zentrifugation bei 13 000 rpm im Sorvall SE12-Rotor aus Rohlysaten sedimentiert und in 0,5 ml Phosphatpuffer resuspendiert.

Die DNA wurde in Gegenwart von 12,5 mM EDTA, 1% SDS durch dreimalige Phenolextraktion isoliert, Phenol wurde mit Diäthyläther extrahiert, und die DNA wurde durch Äthanolfällung konzentriert. Die DNA wurde in 100 µl Puffer (10 mM Tris HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 5 mM NaCl)

resuspendiert. Mit $\frac{1}{5}$ des Volumens wurden Restriktionsanalysen durchgeführt, Die Hälfte der isolierten Klon-DNA wurde denaturiert, an Nitrozellulosefilter gebunden (Velten et al., 1976) und zur Hybridisation mit in vitro-Transkripten eingesetzt.

2.11.4. Klonanalyse mit pBR322

Das Plasmid pBR322 trägt zwei Antibiotika-Resistenzgene, die der entsprechenden Bakterienzelle erlauben, in Gegenwart von Ampicillin und Tetracyclin zu wachsen. Der einzige HindIII-Schnitt der pBR322-DNA liegt in der Promotorregion des Tetracyclin-Gens, das durch Integration eines zusätzlichen DNA-Fragments an dieser Stelle inaktiviert werden kann. Die als Folge der DNA-Integration auftretende Tetracyclin-Sensibilität kann daher zur Selektion von Hybridplasmiden dienen (Bolivar et al., 1977).

Transformierte E.coli C600-Zellen wurden zur Regeneration der Zellwand zunächst 90 min bei 37°C bebrütet, anschließend auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Ampicillin-resistente Zellen wurden auf Ampicillin- und Tetracyclin-Agarplatten übertragen und wiederum bei 37°C bebrütet. Zellen aus solchen Kolonien, die Ampicillin-resistent, aber Tetracyclin-sensibel waren, wurden zur Klonanalyse in 20 ml TBY-Medium mit Ampicillin bis zu einer Zelldichte von $4x10^8$/ml vermehrt.

Die Zellen wurden durch kurze, niedertourige Zentrifugation sedimentiert und zur Lyse in 100 µl Sucrose-Tris-Lysozym-Lösung (s.2.3.1.) resuspendiert. Nach 10 min bei 0°C wurden 10 µl 0,1 M EDTA zugegeben, und die Suspension wurde weitere 30 min bei 0°C gehalten. Nach Zugabe von 100 µl Lytic-Mix (s.2.3.1.) wurde die Lösung durch 20minütige Zentrifugation bei 15 000 rpm im Sorvall SS34-Rotor geklärt. Der Überstand wurde mit 2 µl Diäthylpyro-

carbonat (Fluka) versetzt und 20 min bei 65°C inkubiert. Die dadurch denaturierten Proteine wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 9980 x g sedimentiert. Die DNA wurde durch Äthanolfällung aus dem Überstand konzentriert und zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

2.12. Methoden zur radioaktiven Markierung von DNA

2.12.1. Synthese von γ^{32}P ATP (Glynn & Chappell, 1964)

Die 5'-Endmarkierung von DNA (s.2.12.2.) erfordert γ^{32}P ATP, das dem bei Maxam & Gilbert (1980) angegebenen Protokoll entsprechend in einer Austauschreaktion aus ATP und ^{32}P (NEN, 100 mCi/ml, Orthophosphorsäure, trägerfrei in wässriger Lösung) nach Glynn & Chappell (1964) synthetisiert wurde.

Die Synthese wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft: je 0,5 µl des Reaktionsgemischs wurden auf eine PEI-Dünnschichtplatte (Macherey & Nagel) aufgetragen. Die Chromatographie wurde in 1 M Essigsäure, 0,85 M LiCl durchgeführt, der Nachweis von γ^{32}P ATP erfolgte autoradiographisch.

Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 2 µl 0,1 M EDTA und 140 µl Äthanol abgestoppt und bei -20°C aufgehoben. Die spezifische Aktivität betrug etwa 1 300 Ci/mM bei einer Konzentration von 10 pM/µl.

2.12.2. 5'-Endmarkierung von DNA (vgl. Chaconas & van deSande, 1980)

Zur Dephosphorylierung wurden zunächst 5 pM eines DNA-Fragments mit überstehendem 5'-Ende in 50 µl 50 mM Tris HCl pH 8,0 gelöst und in Gegenwart von 0,5 Einheiten alkalischer Phosphatase (Kalbsthymus) 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10minütige

Inkubation bei 70°C in Gegenwart von 10 mM EGTA abgestoppt. Zur Hydrolyse der Phosphatase wurde der Ansatz in Gegenwart von 2,5 µl 10% SDS und 25 µg Proteinase K (Merck) für 1 h bei 37°C gehalten. Nach Zugabe von 150 µl TE-Puffer (s.2.3.1.) wurde die Proteinase durch dreimalige Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die DNA wurde durch Äthanolfällung konzentriert und in 50 µl 1 x PNK-Puffer (10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 20 mM Tris HCl pH 9,2, 0,5 mM Spermidin (Sigma)) gelöst.

Zur Markierung wurden 50 pM γ^{32}P ATP (s.2.12.1.) lyophilisiert. Die DNA-Lösung sowie 20 Einheiten T4-induzierter Polynukleotidkinase wurden zu dem ATP gegeben, und der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die Kinase wurde anschließend durch 10minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert, und die DNA wurde entweder elektrophoretisch aufgetrennt oder nach Äthanolfällung direkt weiterverwendet.

2.12.3. 3'-Endmarkierung von DNA (vgl. Donelson & Wu, 1972)

Zur 3'-Endmarkierung wurden 5 pM eines Restriktionsfragments mit überstehendem 5'-Ende zu 50 pM α^{32}P dATP (Amersham Buchler, 250 Ci/25 µl; 2500 Ci/mM, trägerfrei in wässriger Lösung) in 20 mM Tris HCl pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 15 mM ßMercaptoäthanol und 2,5 mM DTT gegeben. Zum Auffüllen von EcoRI-Enden wurden außerdem je 0,25 mM dTTP und dGTP hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit 5 Einheiten des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase aus E.coli 10 min bei 25°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch einen Hitzeschritt (s.2.12.2.) inaktiviert, die DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt oder nach einer Äthanolfällung direkt weiterverwendet.

2.12.4. "Nick Translation" (vgl. Macgregor & Mizuno, 1976)

Zur radioaktiven Markierung durch "Nick Translation" wurde DNA in 50 mM Tris HCl pH 8,0, 5 mM $MgCl_2$, 50 µg/ml BSA, 5 mM ßMercaptoäthanol und je 10 µM dCTP, dGTP und dTTP zu 8 pM α^{32}P dATP (s.2.12.3.) gegeben. Nach Zugabe von 12 Einheiten DNA-Polymerase aus E.coli wurde der Reaktionsansatz 90 min bei 15°C inkubiert. Die DNA-Polymerase wurde durch einen Hitzeschritt (s.2.12.2.) inaktiviert, und die DNA nach einer Äthanolfällung direkt eingesetzt.

2.13. DNA-Sequenzierung (Maxam & Gilbert, 1977)

Die chemische Methode der DNA-Sequenzierung nach Maxam & Gilbert geht von Restriktionsfragmenten aus, die an ihren 5'- oder 3'-Enden mit ^{32}P radioaktiv markiert sind (s.2.12.). Durch Nachschneiden mit einem Restriktionsenzym (s.2.14.) oder durch DNA-Strangtrennung (s.2.5.4.2.) erhält man DNA, die nur an einem Ende eine radioaktive Markierung trägt.

In vier basenspezifischen Reaktionen wird die DNA partiell modifiziert, jede modifizierte Base wird von ihrem Zucker abgespalten, und durch alkalische Hydrolyse wird der DNA-Strang an diesen Stellen gespalten.

Die DNA-Produkte werden unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (s.2.5.4.3.) und autoradiographisch nachgewiesen. Jede Bande im Autoradiogramm repräsentiert eine Kettenlänge ("Sequenzleiter"). Die Sequenz der DNA läßt sich im Autoradiogramm ablesen, indem verfolgt wird, welches der basenspezifischen Reagenzien einen Strangbruch an dem jeweils folgenden Nukleotid verursacht hat.

2.13.1. Lösungen zur DNA-Sequenzierung

Kalbsthymus-DNA:

Kalbsthymus-DNA (Serva) wurde in H_2O gelöst, beschallt, dreimal mit Phenol extrahiert, sechsmal 12 h gegen H_2O dialysiert, lyophilisiert und in H_2O gelöst.

$\frac{3}{2}$ Apurinisierungs-Lösung:

98% Ameisensäure
3% Diphenylamin (Serva)
1 mM EDTA

Kakodylat-Puffer:

50 mM Na-Kakodylat (Serva)
10 mM $MgCl_2$
0,1 mM EDTA

Pyrimidin-Lösung:

60% Hydrazin (Serva) in H_2O

Cytidin-Lösung:

60% Hydrazin
1,5 M NaCl

DMS-Stop-Lösung:

1 M Tris-Acetat pH 7,5
1,5 M Na-Acetat
1,5 M ßMercaptoäthanol
0,05 M EDTA
0,4 mg/ml tRNA (Serva)

Acetat-RNA-Lösung:

300 mM Na-Acetat
0,1 mM EDTA
0,1 mg/ml tRNA

3 M $FeCl_3$ zum Vernichten der Hydrazin-Abfälle

5 N NaOH zum Vernichten der DMS-Abfälle

2.12.2. Durchführung der DNA-Sequenzierung

Zur Vorbereitung auf die basenspezifischen Reaktionen wurden 40 000 bis 80 000 cpm eines an einem Ende mit ^{32}P markierten Restriktionsfragments in Gegenwart von 60 µg Kalbsthymus-DNA mit Äthanol gefällt, getrocknet, in 40 µl H_2O gelöst, auf vier Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und lyophilisiert.

A+G-Reaktion (Davidson & Waymouth, 1944): Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 5 µl H_2O gelöst. Nach Zugabe von 10 µl $\frac{3}{2}$ Apurinisierungs-Lösung wurde der Ansatz 9 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Abkühlen der Probe auf 0^oC und durch Zugabe von 45 µl eiskaltem H_2O. Das Diphenylamin wurde durch dreimalige Extraktion mit Diäthyläther entfernt, und die Probe wurde 4 h lyophilisiert.

G-Reaktion: Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 200 µl Kakodylat-Puffer mit 2 µl Dimethylsulfat (DMS, Ega-Chemie) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde 8 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl DMS-Stop-Lösung zugegeben, und die DNA wurde mit Äthanol gefällt.

T+C-Reaktion: Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 50 µl Pyrimidin-Lösung gelöst und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Acetat-RNA-Lösung abgestoppt, und die DNA wurde mit Äthanol gefällt.

C-Reaktion: Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 50 µl Cytidin-Lösung gelöst und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Acetat-RNA-Lösung abgestoppt, und die DNA wurde mit Äthanol gefällt.

Die mit Äthanol gefällte DNA der vier basenspezifischen Reaktionen wurde durch Zentrifugation sedimentiert, das feuchte Sediment in 250 µl 0,3 M Natriumacetat pH 7,5 aufgenommen und die DNA erneut mit

Äthanol gefällt. Das Sediment wurde dreimal mit 80% Äthanol gewaschen und getrocknet.

Die DNA der vier Reaktionsansätze wurde in je 50 µl 1 M Piperidin (Serva) gelöst und 90 min auf 90°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben abgekühlt und über Nacht lyophilisiert.

Die lyophilisierten Proben wurden in Formamid denaturiert und in Sequenzgelen elektrophoretisch aufgetrennt (s.2.5.4.3.).

2.14. Kartierung von Restriktionsfragmenten

Die Kartierung von Restriktionsfragmenten wurde überwiegend mit einer Methode durchgeführt, die bereits von Kiko et al. (1979) beschrieben wurde und im folgenden am Beispiel der Kartierung der EcoRI-Fragmente der T4 dC-DNA beschrieben werden soll:

T4 dC-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten, und die Fragmente wurden ihrem Molekulargewicht entsprechend in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Kettenlängen der EcoRI-Fragmente wurde durch Vergleich ihrer elektrophoretischen Mobilität mit der von DNA-Fragmenten bekannter Kettenlängen (s.3.1.) bestimmt.

Zur Kartierung der EcoRI-Schnitte wurde T4 dC-DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt, deren Schnittstellen auf T4-DNA bereits bekannt waren (Kiko et al., 1979, Rüger et al., 1979). Die entstandenen Fragmente wurden in präparativen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und aus den Gelen isoliert (s.2.6.3.).

Die gereinigten Fragmente wurden entweder nur mit EcoRI oder mit EcoRI und einer zweiten Restriktionsendonuklease geschnitten (Doppeldigest), deren Schnittstellen auf T4 dC-DNA, d.h. innerhalb der isolierten Fragmente, bekannt waren. Diese Restriktionsfragmente (Subfragmente) wurden in analytischen Agarosegelen auf-

getrennt. Durch Vergleich mit Molekulargewichtsmarkern (s.o.) wurden die Kettenlängen und die Stöchiometrie der entstandenen Subfragmente bestimmt.

Im Falle der Restriktion des isolierten Restriktionsfragments nur mit EcoRI gibt es mehrere Möglichkeiten:

1. Das Fragment zeigt weiterhin sein ursprüngliches Molekulargewicht, d.h. es gibt keine EcoRI-Schnittstelle in diesem DNA-Abschnitt.

2. Es entstehen zwei Subfragmente, deren Molekulargewichte sich zum ursprünglichen Molekulargewicht des untersuchten Fragments addieren lassen, d.h. es gibt einen EcoRI-Schnitt in diesem Fragment; die zwei Subfragmente sind die sog. Termini zweier EcoRI-Fragmente.

3. Es entstehen drei - oder mehr - Subfragmente, von denen eines - oder mehrere - sich dem T4 dC-DNA EcoRI-Restriktionsmuster zuordnen lassen, also EcoRI-Fragmenten entsprechen. Jeweils zwei Subfragmente dagegen sind keine echten EcoRI-Fragmente, sondern Termini.

Die Doppelrestriktion (s.o.) dient der Kartierung der beobachteten EcoRI-Subfragmente innerhalb des untersuchten Abschnitts. Das Fehlen von EcoRI-Subfragmenten bzw. das Auftreten neuer Subfragmente im Doppelrestriktionsansatz zeigt, welches der EcoRI-Subfragmente Schnitte der zweiten Nuklease trägt; das Molekulargewicht der neuen Subfragmente gibt erste Anhaltspunkte dafür, wie dieses EcoRI-Fragment relativ zu den bekannten Restriktionsschnitten liegt.

Zur weiteren Kartierung wurden Restriktionsanalysen überlappender Fragmente, Doppelrestriktionen mit EcoRI und weiteren Enzymen, deren Schnittstellen auf den betreffenden Fragmenten bekannt waren, sowie Restriktionsanalysen isolierter EcoRI-Fragmente mit diesen Enzymen durchgeführt. Auch die Überprüfung von Restriktionskarten (s.3.1.) sowie die Kartierung von Schnitten der Restriktionsendonukleasen BamHI, XhoI, ClaI, HindIII, HpaII und HinfI auf T4 dC-DNA wurden analog der oben beschriebenen Methode durchgeführt.

Kleine Fragmente sowie Restriktionsschnitte, deren Lage nicht durch bekannte Restriktionsschnitte festgelegt werden konnten, wurden darüber hinaus nach der Methode von Smith & Birnstiel (1976) kartiert:

Isolierte Restriktionsfragmente wurden an ihren 5'- oder 3'-Enden mit ^{32}P markiert (s.2.12.) und anschließend mit einer Restriktionsendonuklease behandelt, die nur einen Schnitt in das betreffende Fragment setzt. Die beiden Subfragmente trugen dann nur noch an jeweils einem Ende die radioaktive Markierung. Die Subfragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und in Gegenwart von 10 µg Kalbsthymus-DNA (s.2.13.1.) durch Inkubation für 5, 10, 15 und 20 min mit einer Einheit des zu untersuchenden Restriktionsenzyms partiell geschnitten. Es entstand eine Serie überlappender Restriktionsfragmente, die elektrophoretisch getrennt und autoradiographisch nachgewiesen wurden. Im Autoradiogramm sind jedoch nur die Partialprodukte sichtbar, denen der markierte Terminus gemeinsam ist. Die durch Vergleich mit Marker-DNA bestimmten Kettenlängen der einzelnen Partialprodukte geben daher direkt die Entfernung der Restriktionsschnitte zum markierten Ende.

Diese Methode wurde vor allem zur Feinkartierung der Region zwischen 150,76 kb und 143,25 kb (vgl.3.4.) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Physikalische Kartierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 64 von 71 identifizierten EcoRI-Schnitten auf T4 dC-DNA kartiert. Außerdem wurden die KpnI- und die BglII-Karte sowie einige XhoI-Schnitte überprüft (s.u.), die restlichen XhoI-Schnitte und der BamHI-Schnitt wurden in Zusammenarbeit mit U. Rohr (Bochum) kartiert. Die Schritte, die zur Aufstellung der Restriktionskarten führten, können wegen des Umfangs der benutzten Daten hier nicht im Detail dargestellt werden. Die physikalischen Karten sind jedoch publiziert (Kiko et al., 1979, Rüger et al., 1979, Niggemann et al., 1981), so daß nähere Angaben zur Kartierung den Veröffentlichungen entnommen werden können. Eine methodische Erläuterung des Prinzips, nach dem die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen festgelegt wurden, enthält Kapitel 2.14. Abbildung 21 - als Faltkarte am Ende dieser Arbeit - zeigt zusammenfassend die Kartierungsergebnisse sowie die physikalischen Karten der T4 dC-DNA, die in der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik (Bochum) aufgestellt wurden und mit deren Hilfe die Kartierung der EcoRI-Schnitte durchgeführt wurde.

Dieses Kapitel erläutert exemplarisch die Kartierung von EcoRI-Schnitten in einer Region des T4-Genoms. Abbildung 4 zeigt das Restriktionsmuster, das nach Behandlung von T4 "rIIH23"-DNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI und nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente entsteht. Die Kettenlängen der EcoRI-Fragmente wurden durch Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Kettenlänge bestimmt (s. 2.14.). Als Molekulargewichtsmarker dienten die EcoRI-Fragmente der DNA der Phagen T5 st0 und λ,cI857, Sam7 sowie die HinfI- und HpaII-Fragmente der DNA des Phagen fd (Gabain et al., 1976, Daniels et al.,

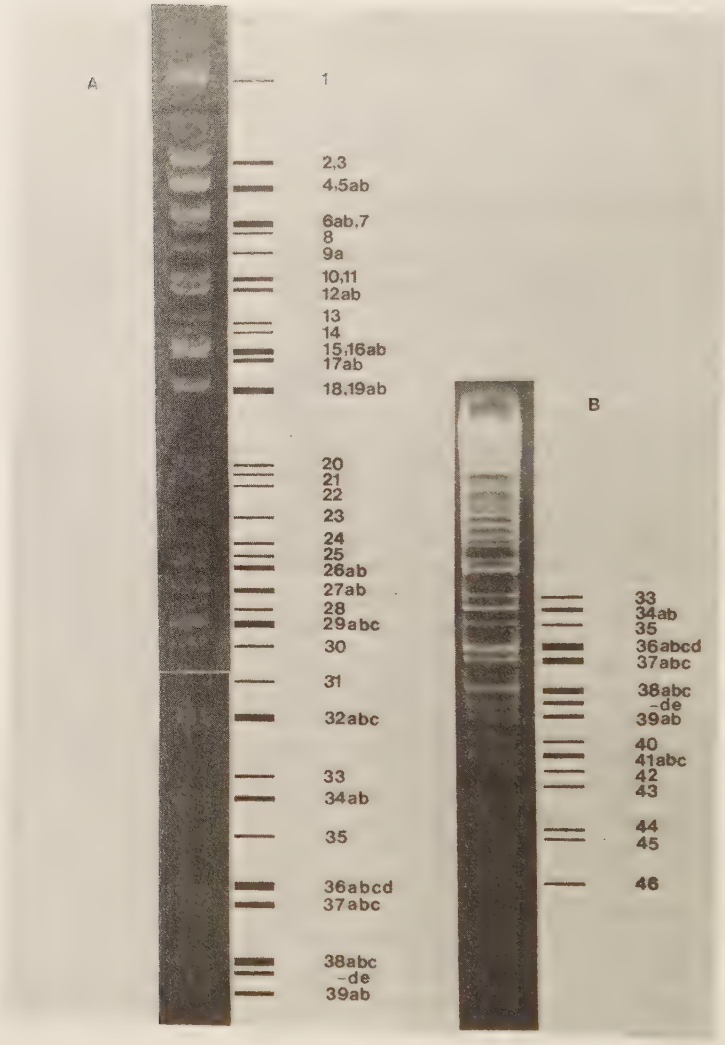


Abbildung 4: EcoRI-Fragmente der T4 "rIIH23"-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 35 cm langen 0,8%-(A) und in einem 12 cm langen 2%-(B) Agarosegel. Zur Benennung der Fragmente s. Tabelle 3.

Tabelle 3: Kettenlängen der EcoRI-Fragmente aus T4 dC-DNA

EcoRI-Fragment[1)]	MW (kb)	EcoRI-Fragment	MW (kb)
1	11,8		
2	6,3	24	2,0
3	6,1	25	1,9
4	5,7	26ab	1,8
5ab	5,6	27ab	1,7
6ab	4,8	28	1,6
7	4,8	29abc	1,5
8	4,7	30	1,45
9a	4,25	31	1,3
9b*	4,15	32abc	1,25
10	3,95	33	1,15
11	3,8	34ab	1,1
12ab	3,7	35*	1,05
13	3,3	36abcd	0,9
14	3,25	37abc	0,8
15	3,15	38abcde**	0,7
16ab	3,1	39ab	0,6
17ab	3,0	40	0,55
18	2,75	41abc	0,5
19ab	2,7	42	0,45
20	2,3	43	0,35
21	2,2	44	0,25
22	2,15	45	0,2
23	2,05	46	0,15

1) Die Benennung der Fragmente erfolgte ihren Molekulargewichten entsprechend. So gibt z.B. die Bezeichnung EcoRI-1 an, daß es sich um das größte der Fragmente handelt, die nach Einwirkung der Restriktionsendonuklease EcoRI auf T4 dC-DNA entstehen. Bilden mehrere Fragmente eine Bande im Gel, so wurde das durch Kleinbuchstaben - ab... - gekennzeichnet.

* Das Fragment EcoRI-9b entsteht nur aus T4 sa49-DNA, das Fragment EcoRI-35 dagegen nur aus "rIIH23"-DNA (vgl. 3.2.).

** Die Fragmente EcoRI-38abcde bilden in 1%-Agarosegelen häufig eine Bande und wurden daher mit einer Zahl bezeichnet, obwohl sie in Abbildung 4 als zwei Banden zu erkennen sind.

1980, Beck et al., 1978). Abbildung 4 gibt neben den Restriktionsmustern die Benennung, Tabelle 3 auch die Molekulargewichte der EcoRI-Fragmente der T4 dC-DNA an.

Zur Kartierung dieser EcoRI-Fragmente wurden solche Restriktionsfragmente der T4 dC-DNA isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen, deren Lage auf der physikalischen Karte bereits bekannt war (s. 2.14.). Abbildung 5 zeigt, welche EcoRI-Subfragmente aus den Fragmenten XhoI-11, XhoI-7 und SalI-4 entstehen und welche dieser EcoRI-Subfragmente wiederum XbaI-, XhoI- und SalI-Schnitte tragen. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 6 - als Faltkarte am Ende dieses Kapitels - eine schematische Darstellung der Restriktionsschnitte innerhalb dieser Fragmente.

XhoI-11 wird von EcoRI in zwei Subfragmente mit 2,6 kb und 1,5 kb zerlegt (s. Abb. 5, Kanal 2). Der XbaI-Schnitt teilt das 2,6 kb-Subfragment in zwei Teile mit 2,1 kb und 0,5 kb (s. Abb. 5, Kanal 3).

Aus XhoI-7 entstehen vier EcoRI-Subfragmente von 5,6 kb, 2,1 kb, 1,35 kb und 0,55 kb (s. Abb. 5, Kanal 5). Der SalI-Schnitt teilt das 5,6 kb-Fragment in zwei 2,8 kb-Fragmente (s. Abb. 5, Kanal 4).

SalI-4, das mit den beiden XhoI-Fragmenten 11 und 7 überlappt (s. Abb. 6), enthält acht EcoRI-Subfragmente: 3,95 kb, 2,8 kb, zweimal je 2,0 kb, 1,8 kb, 1,7 kb, 0,6 kb und 0,55 kb (s. Abb. 5, Kanal 7). XbaI zerlegt das 3,95 kb-Fragment in 3,45 kb- und 0,5 kb-Fragmente (s. Abb. 5, Kanal 8). XhoI zerlegt das 3,95 kb-Fragment in 1,35 kb- und 2,6 kb-Fragmente, und statt des 1,7 kb-Fragments entsteht nach Doppelrestriktion mit EcoRI und XhoI ein 1,5 kb-Fragment (s. Abb. 5, Kanal 9).

Durch Kombination dieser Ergebnisse läßt sich auf Grund der bekannten XhoI-, XbaI- und SalI-Schnitte im Überlappungsbereich der untersuchten Fragmente die folgende Reihenfolge der EcoRI-Subfragmente ableiten: 2,1 kb, 5,6 kb, 0,55 kb, 3,95 kb, 1,7 kb.

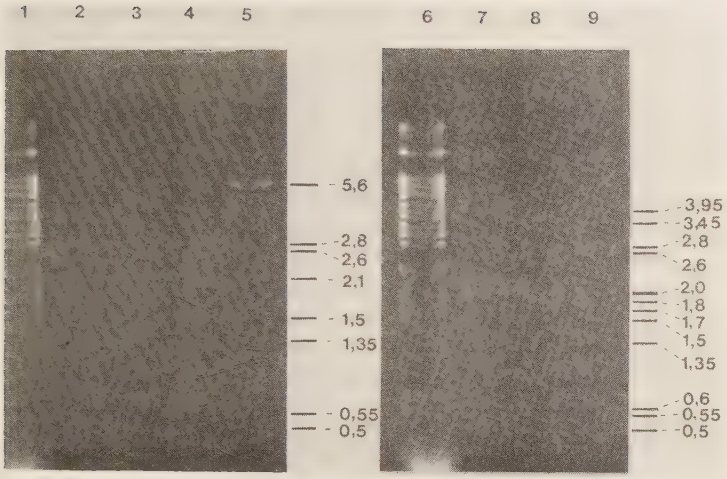


Abbildung 5: EcoRI-Restriktionsschnitte in den Fragmenten XhoI-7, XhoI-11 und SalI-4. Die Abbildung zeigt ein 1%-Agarosegel, die Kanäle 1 und 6 enthalten als Molekulargewichtsmarker die EcoRI-Fragmente der T4 saΔ9-DNA. Die übrigen Kanäle zeigen im einzelnen:

2: XhoI-11 geschnitten mit EcoRI
3: XhoI-11 geschnitten mit EcoRI und XbaI
4: XhoI-7 geschnitten mit EcoRI und SalI
5: XhoI-7 geschnitten mit EcoRI
7: SalI-4 geschnitten mit EcoRI
8: SalI-4 geschnitten mit EcoRI und XbaI
9: SalI-4 geschnitten mit EcoRI und XhoI

Das Fragment mit 2,1 kb zu Beginn des Fragments XhoI-7 (s. Abb. 6) kann sowohl ein vollständiges EcoRI-Fragment als auch ein Terminus (T) eines größeren EcoRI-Fragments sein. Durch weitere Schnitte in überlappenden Fragmenten (keine Abbildung) konnte aber gezeigt werden, daß es sich um den Terminus des EcoRI-Fragments EcoRI-7 handelt.

Die Reihenfolge der Fragmente mit 2,0 kb, 1,8 kb und 0,6 kb zwischen 64,2 kb und 59,8 kb auf der physikalischen Karte sowie die Reihenfolge sechs weiterer EcoRI-Fragmente zwischen 161,85 kb und 158,0 kb (vgl. Abb. 21 und Tab. 10, Anhang) ließ sich dagegen nicht klären, da es in den beiden Bereichen keine bekannten Schnittstellen gibt.

Alle anderen identifizierten EcoRI-Schnitte auf T4 saΔ9-DNA wurden durch die Kombination analoger Restriktionsanalysen überlappender Fragmente und durch die Restriktion isolierter EcoRI-Fragmente mit Enzymen, deren Schnittstellen auf T4 dC-DNA bekannt sind, kartiert.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 21 (s. Ende der Arbeit) die Schnitte der Restriktionsendonukleasen BamHI, SmaI, KpnI, SalI, BglII, XhoI, XbaI, HaeII und EcoRI auf T4 saΔ9-DNA. Bei der Überprüfung der KpnI- und BglII-Karte sowie einiger XhoI-Schnitte (s.o.) konnte aus jeweils zwei alternativen Reihenfolgen zugunsten der folgenden Fragmentreihenfolgen entschieden werden: KpnI-1b-1c-5-3-2, BglII-1-2b-3-4, BglII-6-8b-7b-7a-5-9-8a und XhoI-10-5b-9c-9b.

Tabelle 10 (s. Anhang) gibt die Molekulargewichte der in Abbildung 21 dargestellten Fragmente sowie die Positionen der entsprechenden Restriktionsschnitte relativ zur genetischen Karte des Phagen T4 an (vgl. 3.2.). Mit Ausnahme der HaeII- und der EcoRI-Schnitte sind die Molekulargewichte und Schnittpositionen auf deletionsfreie DNA bezogen angegeben. Für Hae II und EcoRI liegen nur die Daten der "rIIH23"- und der T4 saΔ9-DNA vor.

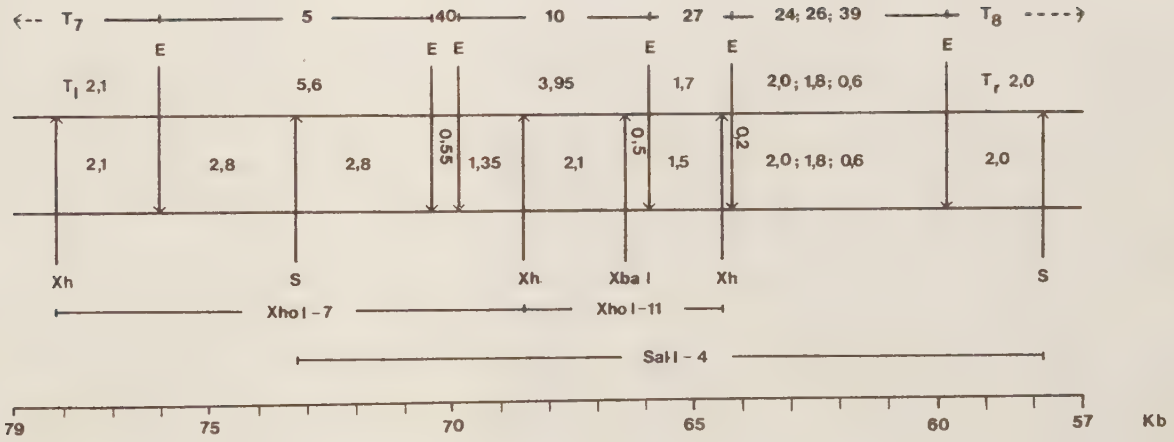


Abbildung 6: Schematische Darstellung der EcoRI-Restriktionsschnitte in den Restriktionsfragmenten XhoI-7, XhoI-11 und SalI-4. Der untere Maßstab gibt in kb die Position der Restriktionsschnitte bezogen auf die genetische Karte des Phagen T4 an ("map position", vgl. 3.2.). Restriktionsschnitte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Zahlen zwischen den Pfeilen geben in kb die Kettenlängen der EcoRI-Subfragmente bzw. -Fragmente an. Die Bezeichnung der Restriktionsfragmente oberhalb und unterhalb der Pfeile entspricht der in Abbildung 21 (am Ende dieser Arbeit) und Tabelle 10 (Anhang). Die Restriktionsendonukleasen EcoRI, SalI und XhoI wurden mit "E", "S" und "Xh" bezeichnet. Die Abkürzungen T_l, T_r, T_7 und T_8 bedeuten: "linker", "rechter" Terminus bzw. Terminus der Fragmente EcoRI-7, -8.

3.2. Zuordnung der physikalischen zur genetischen Karte des Bakteriophagen T4

Um das Ziel der im vorigen Kapitel beschriebenen Restriktionsanalyse, die Untersuchung definierter Abschnitte der DNA des Phagen T4, zu erreichen, war es notwendig, die physikalische mit der genetischen Karte des Phagen zu korrelieren. Diese Zuordnung erfolgte durch die physikalische Kartierung der rII-Region, einer genetisch besonders gut untersuchten Region der T4-DNA (Benzer, 1961). Die zyklische Permutation des T4-Genoms erlaubt nur eine willkürliche Festlegung eines Anfangs- bzw. Endpunkts der DNA. Der Beginn des T4-Genoms wurde durch das rIIA-Gen definiert, das rIIB-Gen liegt am Ende der genetischen Karte (s. Abb. 2). Positionsangaben ("map position") von Genen oder Restriktionsschnitten verstehen sich daher als in kb gemessener Abstand zu diesem nominellen Nullpunkt zwischen den Genen rIIA und rIIB.

Die T4-Mutanten T4 saΔ9 und T4 "rIIH23" tragen unterschiedlich große DNA-Deletionen, die im Bereich der rII-Region liegen. Die saΔ9-Deletion wurde von Depew et al. (1975) beschrieben. Sie umfaßt etwa 2500 bp, beginnt in der D1-Region und endet im ac-Gen. Die rIIH23-Deletion ist etwa 4200 bp lang, beginnt im rIIA-Gen und endet im denB-Gen (Bautz & Bautz, 1967). Die unterschiedliche Größe dieser überlappenden Deletionen wurde in vergleichenden Restriktionsanalysen zur Kartierung der rII-Region benutzt. Abbildung 8 - als Faltkarte am Ende dieses Kapitels - zeigt die im folgenden beschriebenen Kartierungsergebnisse in schematischer Zusammenfassung.

Abbildung 7 zeigt die elektrophoretisch getrennten Fragmente der T4 saΔ9-DNA und der "rIIH23"-DNA nach Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen KpnI, BglII, XhoI und EcoRI.

Die Restriktionsfragmente KpnI-3 und BglII-4 der T4 saΔ9-DNA weisen ein um 3,1 kb höheres Molekulargewicht auf als die entsprechenden Fragmente der T4 "rIIH23"-DNA (s. Abb. 7, Kanal 1, 2, 3 und 4).

An Stelle des 1,05 kb-EcoRI-35-Fragments der "rIIH23"-DNA findet man im EcoRI-Muster der T4 saΔ9-DNA ein EcoRI-9b Fragment mit einem Molekulargewicht von 4,15 kb, das mit dem in beiden DNAs enthaltenen EcoRI-9a-Fragment mit 4,25 kb eine Doppelbande bildet (s. Abb. 7, Kanal 14 und 15).

Das XhoI-1-Fragment aus T4 saΔ9-DNA hat ein um 0,9 kb höheres Molekulargewicht als das der T4 "rIIH23"-DNA, wie durch Doppelrestriktion beider DNAs mit BglII und XhoI gezeigt werden konnte: Statt des XhoI-Terminus mit 5,8 kb aus "rIIH23"-DNA entsteht ein 6,7 kb-Terminus aus T4 saΔ9-DNA. Im XhoI-Restriktionsmuster der T4 saΔ9-DNA erscheint zusätzlich das Fragment XhoI-13 mit einem Molekulargewicht von 2,2 kb (s. Abb. 7, Kanal 5 und 6). Insgesamt ergibt sich also wieder eine Molekulargewichtserhöhung um 3,1 kb.

Eine Restriktionsanalyse der deletionsfreien DNA der Mutante T4 alc536 bestätigte diese Ergebnisse. Die Restriktionsfragmente KpnI-3, BglII-4 und XhoI-13 dieser T4 alc536-Mutante zeigten ein um 2,5 kb höheres Molekulargewicht als die entsprechenden Fragmente der T4 saΔ9-DNA (s. Abb. 7, Kanal 7, 8 und 9).

Das SalI- und XbaI-Restriktionsmuster der T4 alc 536-DNA zeigen an Stelle der Fragmente SalI-2b mit 33,24 kb bzw. XbaI-2a mit 18,2 kb jeweils zwei neue Fragmente mit 22,7 kb und 13,04 kb im Fall der SalI-Restriktion und mit 14,7 kb und 6,0 kb im XbaI-Muster (s. Abb. 7, Kanal 10,11, 12 und 13), was wiederum einer Molekulargewichtserhöhung um 2,5 kb gegenüber den Fragmenten der T4 saΔ9-DNA entspricht.

Diese Ergebnisse bestätigen die oben angegebene

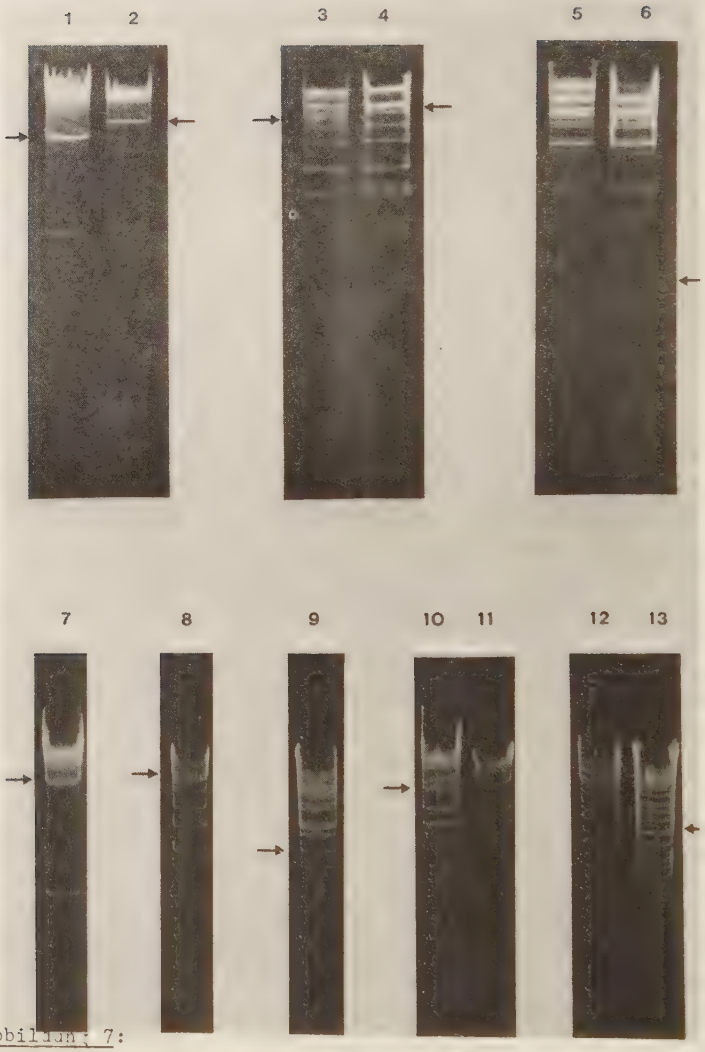


Abbildung 7:

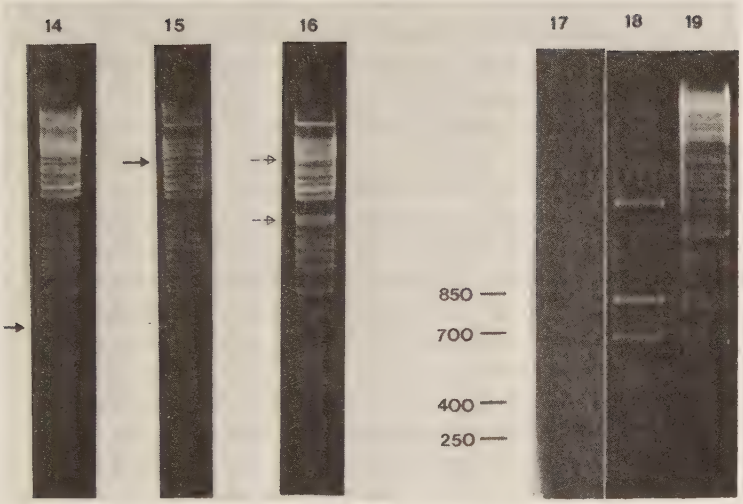


Abbildung 7: Vergleichende Restriktionsanalyse der DNA der T4-Mutanten T4 "rIIH23", T4 saΔ9 und T4 alc536. Die Restriktionsfragmente wurden in 0,8%-(1 bis 11), 1%-(12 und 13), 1,2%-(14 bis 16) bzw. 2%-(17 bis 19) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Fragmente, die auf Grund der unterschiedlichen Deletionen Molekulargewichtsveränderungen erfahren, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Abbildung zeigt im einzelnen: "rIIH23" x KpnI (1), saΔ9 x KpnI (2), "rIIH23" x BglII (3), saΔ9 x BglII (4), "rIIH23" x XhoI (5), saΔ9 x XhoI (6), alc536 x KpnI (7), alc536 x BglII (8), alc536 x XhoI (9), alc536 x SalI (10), saΔ9 x SalI (11), saΔ9 x XbaI (12), alc536 x XbaI (13), "rIIH23" x EcoRI (14), saΔ9 x EcoRI (15), alc536 x EcoRI (16), XhoI-13 x HindIII (17), fd x HpaII (18), "rIIH23" x EcoRI (19)

Größe der saΔ9-Deletion von 2,5 kb, da jeweils ein Restriktionsfragment der deletionsfreien DNA um 2,5 kb größer ist als das entsprechende Fragment der saΔ9-DNA.

Die alc536-DNA enthält mindestens einen zusätzlichen EcoRI-Schnitt, da im alc536-EcoRI-Restriktionsmuster (s. Abb. 7, Kanal 16) kein Fragment mit 6,65 kb, d.h. größer als EcoRI-2, auftritt, wie es durch Molekulargewichtserhöhung des EcoRI-9b-Fragments der saΔ9-DNA um 2,5 kb zu erwarten wäre. Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, daß dieser zusätzliche EcoRI-Schnitt im denB-Gen bei 164,15 kb liegt (s. Abb. 8) und daß die beiden, dem EcoRI-9b Fragment der saΔ9-DNA entsprechenden Fragmente der alc536-DNA mit den Restriktionsfragmenten EcoRI-8 und EcoRI-20 komigrieren.

Die Summe der Kettenlängen der "rIIH23"-DNA-Restriktionsfragmente ist um 3,1 kb kleiner als die der saΔ9-DNA bzw. um 5,6 kb kleiner als die der deletionsfreien DNA. Daraus läßt sich folgern, daß es sich bei der "rIIH23"-Deletion nicht um die ursprüngliche, von Bautz beschriebene 4,2 kb lange rIIH23-Deletion (s.o.), sondern um die um 1,4 kb größere, hier "rIIH23" genannte, Deletion handelt, die sich vom Beginn des rIIA-Gens bis in das ac-Gen des Phagen erstreckt (s. Abb. 8), wie bereits von Kutter et al. (1975) berichtet wurde. Yee & Marsh (1981) geben die Länge der hier benutzten, von den Autoren rIIH23B genannten Deletion mit 5,8 kb an.

Der Bereich der physikalischen Karte, im dem die Restriktionsfragmente mit je nach vorhandener Deletion unterschiedlichen Molekulargewichten liegen, trägt die rII-Region des Phagen T4. Abbildung 21 (Faltkarte am Ende dieser Arbeit) zeigt, daß sich die betroffenen Fragmente KpnI-3, BglII-4, XhoI-1 und XhoI-13, EcoRI-9b, SalI-2b und XbaI-2a überlappen.

Zur genaueren Kartierung der rII-Region innerhalb dieses Überlappungsbereichs wurden die Restriktionsfragmente EcoRI-9ab und XhoI-13 der saΔ9-DNA aus präparativen Agarosegelen isoliert und mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten.

Das EcoRI-9a-Fragment liegt im Bereich des Gens 32 des Phagen. Es enthält keinen XhoI-Schnitt; die HindIII-Schnitte wurden kartiert (s. 3.4.1.). Das EcoRI-9b-Fragment, das die saΔ9-Deletion enthält, trägt die beiden XhoI-Schnitte, die das XhoI-13-Fragment begrenzen (s. Abb. 8). Aus dem Fragment XhoI-13 entstehen vier HindIII-Subfragmente von 850, 700, 400 und 250 bp Länge (s. Abb. 7, Kanal 17). Durch Vergleich mit dem HindIII- und dem HindIII-. XhoI-Restriktionsmuster der EcoRI-9ab-Fragmente konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Subfragmenten mit 800 und 400 bp um echte HindIII-Fragmente handelt, während die 700 und 250 bp-Subfragmente Termini des XhoI-13-Fragments sind (s. Abb. 8). In der Mitte des HindIII-Fragments mit 850 bp endet das rIIA-Gen und beginnt das rIIB-Gen (Selzer et al., 1978, Pribnow et al., 1981); dort liegt der genetische Nullpunkt des T4-Genoms.

Das Fragment XhoI-1 der saΔ9-DNA ist um 0,9 kb größer als das der "rIIH23"-DNA (s.o.), nicht aber das Fragment XhoI-6, das ebenfalls dem Fragment XhoI-13 benachbart ist (s. Abb. 21 am Ende dieser Arbeit). Der neu auftretende XhoI-Schnitt der saΔ9-DNA liegt folglich auf der Seite des XhoI-1-Fragments in der Region, die der "rIIH23"-DNA, nicht aber der saΔ9-DNA fehlt: in der rIIA/rIIB-Region.

Der zusätzliche SalI- bzw. XbaI-Schnitt der deletionsfreien DNA liegt in dem Bereich, der in der saΔ9-DNA deletioniert ist, d.h. in der sog. D-Region (s. Abb. 8). Daraus läßt sich die Orientierung der physikalischen Karte relativ zu dem in der Mitte des 850 bp langen XhoI-13-HindIII-Subfragments festgelegten genetischen Nullpunkts ableiten.

Abbildung 8 zeigt die Anordnung der oben erwähnten Restriktionschnitte und Deletionen im Bereich der rII-Region des Phagen T4 sowie die daraus resultierende Zuordnung der physikalischen zur genetischen Karte.

Diese Korrelation der Karten erlaubt die Zuordnung der Restriktionsschnitte zu genetischen Positionen ("map position"), wodurch jedem Restriktionsfragment ein genetisch definierter Teilbereich des T4-Genoms zugeordnet werden kann. Detaillierte Angaben zur physikalischen und genetischen Karte enthalten Abbildung 20 und die Tabellen 10 und 11 (s. Anhang). Die dort gezeigte Zuordnung von Genorten zu Restriktionsfragmenten wurde anhand von Vergleichen zwischen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten EcoRI-Karte (s.3.1.) und Klonierungsdaten anderer Autoren (s. Tab. 9, Kapitel 4.1.) vorgenommen.

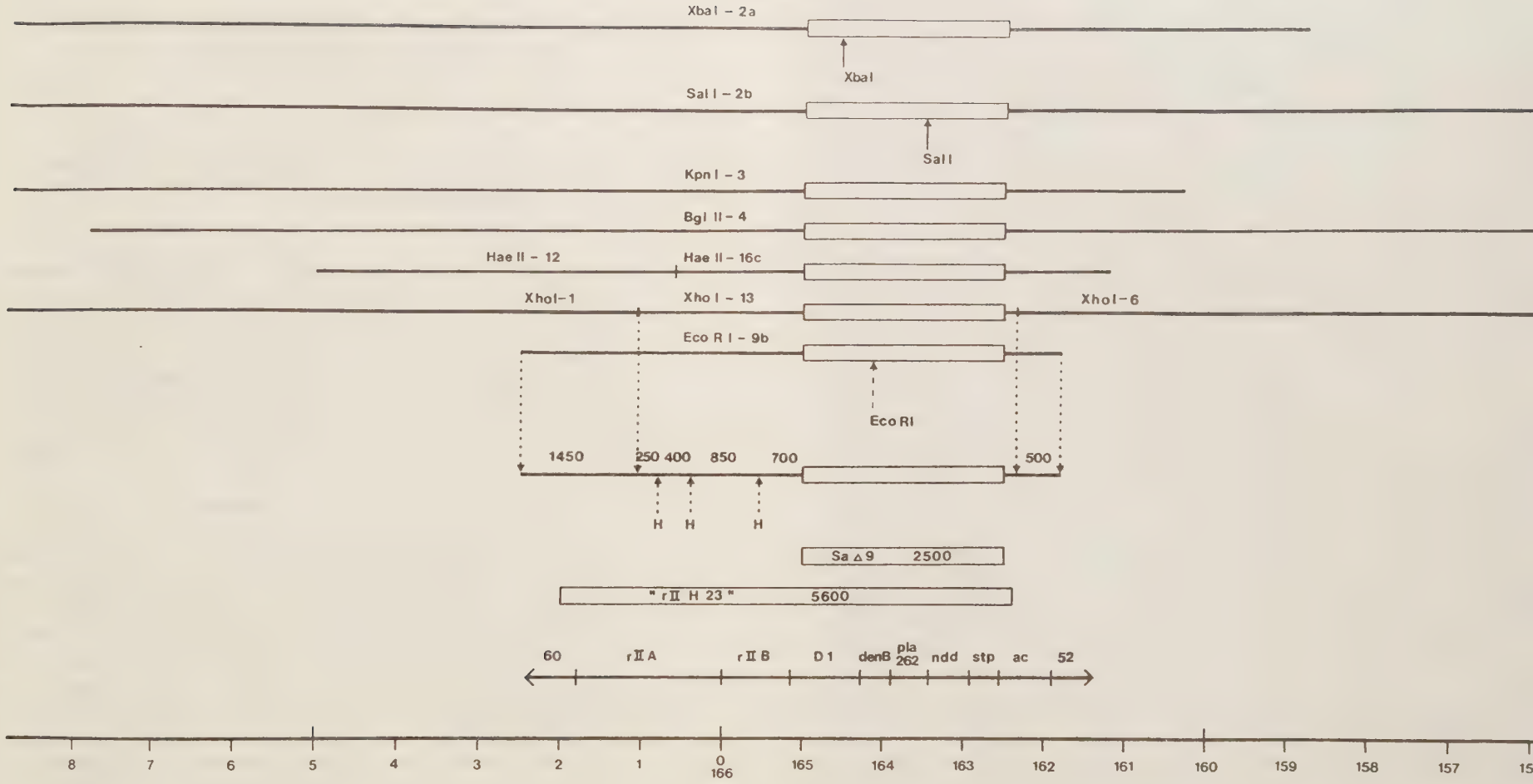


Abbildung 8: Physikalische Karte der rII-Region des Bakteriophagen T4.
Die Abbildung zeigt die Lage der im Text erwähnten Restriktionsfragmente, die HindIII-Restriktionsschnitte innerhalb der Fragmente EcoRI-9b und XhoI-13 der saΔ9-DNA (H) sowie die Lage der zusätzlichen Restriktionsschnitte der deletionsfreien DNA des Phagen T4 alc536. Die Skala unter der Abbildung gibt in kb den Abstand zum genetischen Nullpunkt. Die Lage der Deletionen "rIIH23" und saΔ9 sowie die Orientierung der Restriktionsschnitte relativ zu dem in der Mitte des 850 bp-HindIII-Fragments kartierten (Pribnow et al., 1981) Nullpunkts ergibt sich aus den im Text beschriebenen Ergebnissen.

3.3. Lokalisation von Bereichen früher Transkription auf der DNA des Bakteriophagen T4

3.3.1. Hybridisation von in vivo-RNA mit Restriktionsfragmenten der T4 dC-DNA

Zur Kartierung früher Transkriptioneinheiten des Bakteriophagen T4 wurden zunächst DNA:RNA-Hybridisationen durchgeführt. BglII- und XhoI-Fragmente der T4 "rIIH23"-DNA wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen denaturiert und an Nitrozellulosefilter gebunden. Diese Filter wurden unter Hybridisationsbedingungen mit ^{125}J-markierter RNA inkubiert, die zu unterschiedlichen Zeiten zwischen 1,5 min und 20 min nach Infektion mit T4 Wildtypphagen aus E.coli BA-Bakterien isoliert worden war.

Die Auswertung der Autoradiogramme dieser Hybridisationsfilter zeigte, daß präreplikative RNA mit Bereichen der XhoI-Fragmente 1, 3, 4ab, 6, 7, 8 und 11 (s. Abb. 9A) und der BglII-Fragmente 1, 2ab, 3, 4, 6, 7ab und 8ab (s. Abb. 9B) hybridisiert. Zu den verschiedenen frühen Zeiten des Infektionsverlaufs wurden leichte Verschiebungen dieses Musters gefunden: 1,5 min nach Infektionsbeginn hybridisieren die BglII-Fragmente 2ab, 3, 4 und 6 in etwa gleichem Maße. Zu den Zeiten 3 min, 3,5 min und 5 min nach Infektionsbeginn ist BglII-4 das am stärksten hybridisierende Fragment, und 6 min nach Infektionsbeginn ergibt sich eine Intensitätsverschiebung zu den Fragmenten BglII-2ab.

Hybridisation postreplikativer RNA zeichnet sich durch das Auftreten der BglII-Fragmente 5 und 9 im Autoradiogramm aus (s. Abb. 9C). In Versuchen mit 15 min nach Infektionsbeginn isolierter RNA ist die Hybridisation der BglII-Fragmente 2ab, 4 und 6 deutlich schwächer

als in analogen Versuchen mit früher RNA. Die BglII-Fragmente 3, 5 und - relativ zum Molekulargewicht - BglII-9 sind die am stärksten hybridisierenden Fragmente, sie entsprechen also Genomabschnitten, die zu späten Zeiten stark transkribiert werden.

BglII-3 wird auch früh in vivo und in vitro stark transkribiert (s. Abb. 9B und Abb. 10, Kanal 3), die starke Hybridisation auch zu späten Zeiten im Infektionsverlauf deutet auf "quasi late" Gene in diesem Bereich hin (vgl. 1.2.).

BglII-5 und -9 dagegen werden nur zu späten Zeiten stark transkribiert. Abbildung 21 (am Ende dieser Arbeit) und Tabelle 10 (s. Anhang) zeigen, daß diese beiden Fragmente zwischen 114 kb und 100,1 kb kartiert wurden und somit innerhalb einer der späten Regionen liegen. Ein Vergleich mit Tabelle 11 (s. Anhang) zeigt, daß BglII-5 das Gen 23 trägt, dessen Genprodukt - das Haupt-Kopfprotein - das am stärksten synthetisierte T4-spezifische späte Protein ist (O'Farrell & Gold, 1973a, Young et al., 1981).

Die Auswertung der Hybridisationsversuche mit früher in vivo RNA wird durch die Größe der Restriktionsfragmente erschwert. Da die verwendete "rIIH23"-DNA durch Resthydroxymethylierung zur Bildung von Partialrestriktionsprodukten neigt (s. oberer Bereich der Abbildung 9A: "P"), wurden BglII-Fragmente eingesetzt, die aus präparativen Gelen durch KJ-Gradientenzentrifugation (Blin et al., 1975) isoliert worden waren. Diese Methode führte jedoch zu hohen Verlusten bei großen Fragmenten, so daß das Fragment BglII-1 auf den Filtern unterrepräsentiert war. Die Hybridisation präreplikativer RNA mit einem Teil des Fragments läßt sich durch die Hybridisation früher RNA mit den XhoI-Fragmenten 3, 7 und 11 nachweisen (s.o.), die dem mittleren Teil des BglII-1-Fragments entsprechen, der auch stark mit in vitro synthetisierter RNA hybridisiert (vgl. Abb. 11).

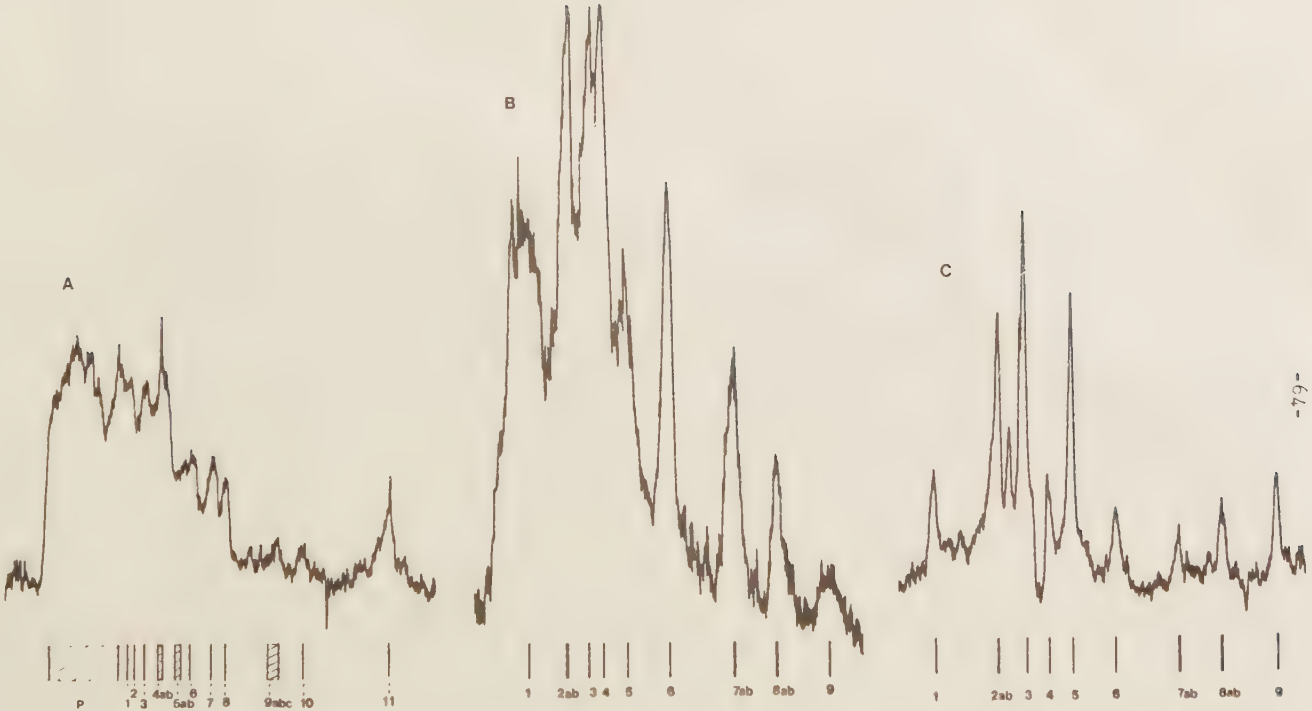


Abbildung 9: DNA:RNA-Hybridisationen. Die entsprechenden Southern-Filter (schematische Darstellung unter den Scans) trugen je 2,5 µg XhoI- (A) bzw. BglII- (B, C) Restriktionsfragmente der T4 "rIIH23"-DNA. Zur Hybridisation wurden je 0,5 µg T4-spezifische RNA eingesetzt, die 2 min (A), 1,5 min (B) bzw. 15 min (C) nach Infektionsbeginn isoliert worden war. Die Autoradiogramme der Hybridisationsfilter wurden mit einem Mikrodensitometer (Joyce-Löbel) ausgewertet.

Außerdem wird die Interpretation der Daten durch das Auftreten von Doppelbanden erschwert, so daß sich, wie im Fall der Fragmente XhoI-4ab und BglII-2ab, -7ab und -8ab, keine Aussage darüber machen läßt, ob beide oder nur eines der die Doppelbande bildenden Fragmente zur Hybridisation beiträgt.

Zusammenfassend läßt sich als Ergebnis dieser Untersuchungen jedoch festhalten, daß präreplikative RNA vorrangig mit Restriktionsfragmenten hybridisiert, die zwischen 78,1 kb und 48,9 kb (XhoI-7, -11 und -3), zwischen 39,4 kb und 114 kb (BglII-2b, -3, -4, -2a, -6, -8b, und -7ab) bzw. zwischen 29,3 kb und 126 kb (XhoI-8, -1, -6, und -4ab) kartiert wurden.

3.3.2. Identifizierung von in vitro transkribierten Bereichen der T4-DNA

Um eine genauere Lokalisation von Bereichen früher Transkription auf der DNA des Phagen T4 zu erreichen, wurden durch Kombination geeigneter Restriktionsschnitte Fragmente geschaffen, die sich einzeln isolieren ließen und , geschnitten mit EcoRI, Fragmente mit niedrigem Molekulargewicht ergaben. Abbildung 11 - als Faltkarte am Ende dieses Kapitels - zeigt die Lage der im folgenden beschriebenen Restriktionsfragmente sowie eine schematische Zusammenfassung der Hybridisationsergebnisse dieses Kapitels.

BglII-Restriktionsfragmente der T4 saΔ9-DNA wurden aus präparativen Agarosegelen isoliert. BglII-1 entspricht mit einem Molekulargewicht von 56,5 kb etwa einem Drittel der gesamten T4-DNA. Das Fragment wurde durch Doppelrestriktion mit KpnI und SalI in sechs kleinere Subfragmente unterteilt.

BglII-2ab, -3 und -4 sind ebenfalls recht große Fragmente, die in Agarosegelen nahe beieinander laufen

bzw. - bei BglII-2ab - eine Doppelbande bilden. Nach Restriktion mit SalI entstehen neun Subfragmente, die elektrophoretisch gut getrennt werden können.

XhoI schneidet je eines der beiden die Doppelbanden BglII-7ab und -8ab bildenden Fragmente einmal, so daß sechs Subfragmente entstehen und eine Auflösung der Doppelbanden erreicht wird. Die übrigen BglII-Fragmente BglII-5, -6, -9 und -10 brauchten nicht weiter unterteilt zu werden.

Die resultierenden 25 BglII-Fragmente bzw. -Subfragmente wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und nach Denaturierung der DNA an Nitrozellulosefilter gebunden. Die Filter wurden zur Hybridisation mit ^{14}C-markierten in vitro-Transkripten eingesetzt. Abbildung 10 zeigt Autoradiogramme eines solchen Experiments. Tabelle 4A gibt die Größe der Fragmente und Subfragmente und ihre Lage relativ zur genetischen Karte ("map position") an sowie eine Auswertung der Hybridisationen.

Die sieben BglII-Fragmente und -Subfragmente, die starke Hybridisation zeigen (vgl. Tab. 4A: BglII-1/1, BglII-1/3, BglII-3, BglII-4, BglII-2ab,3,4/5, BglII-6 und BglII-8b/1), sowie zusätzlich die Subfragmente BglII-2ab,3,4/4, BglII-8b/2 und BglII-7b/1 wurden aus präparativen Agarosegelen isoliert und mit EcoRI geschnitten. Die EcoRI-Subfragmente wurden in Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und wiederum an Nitrozellulosefilter gebunden. Zur Hybridisation wurde erneut in vitro unter Standardbedingungen synthetisierte RNA eingesetzt. Tabelle 4B gibt die Auswertung der Hybridisationsexperimente.

Auf Grund der in der Tabelle 4 zusammengefaßten Ergebnisse lassen sich drei Regionen festlegen, die nicht mit in vitro synthetisierter T4-RNA hybridisieren. Diese Abschnitte liegen zwischen dem SalI-Schnitt bei 73,2 kb und dem EcoRI-Schnitt bei 122,45 kb, zwischen dem KpnI-Schnitt bei 47,2 kb und dem BglII-Schnitt bei 39,4 kb und zwischen dem SmaI-Schnitt bei 148,7 kb (s. 3.4.1.) und dem EcoRI-Schnitt bei 158 kb.

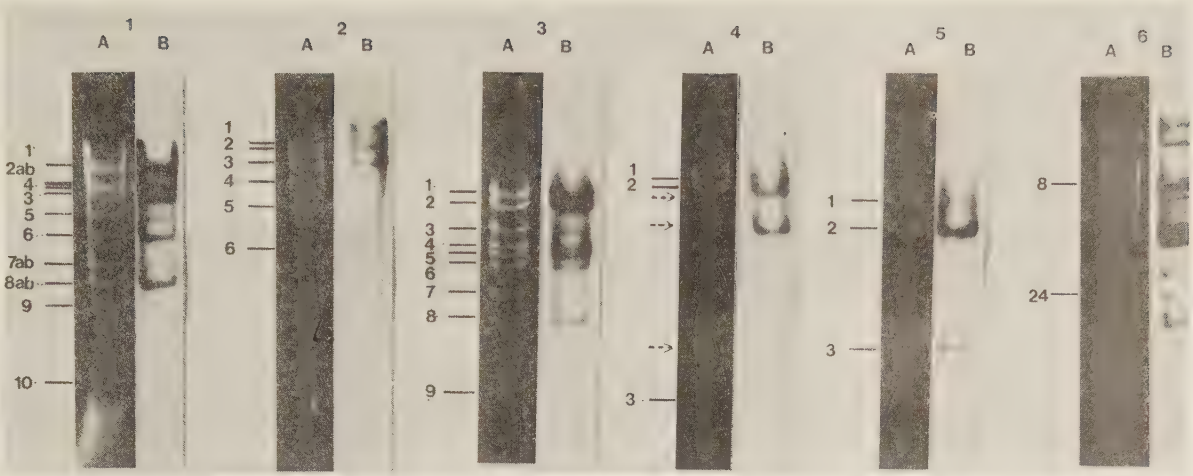


Abbildung 10: Hybridisation zwischen Restriktionsfragmenten der T4 dC-DNA und in vitro an T4 Wildtyp-DNA transkribierter RNA. BglII-Fragmente wurden aus niedrigschmelzender Agarose isoliert, ein Aliquot jedes Transkriptionsansatzes wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Pro Kanal wurden 0,5 bis 2,5 µg T4 saΔ9-DNA und etwa 100 000 cpm ^{14}C-markierter RNA eingesetzt. Die einzelnen Kanäle zeigen in alternierender Reihenfolge Agarosegele (A) und Autoradiogramme (B) der entsprechenden Filter: T4 saΔ9-DNA x BglII (1), BglII-1 x SalI x KpnI (2), BglII-2ab,3,4 x SalI (3), BglII-7ab x XhoI (4), BglII-8ab x XhoI (5), T4 saΔ9-DNA x EcoRI (6). BglII-7ab enthält als Verunreinigung BglII-8ab, die zweite Bande im Autoradiogramm (4B) entspricht BglII-8b/1 (vgl. Tab. 4A).

Tabelle 4: Hybridisation zwischen Restriktionsfragmenten der T4 sa\9-DNA und in vitro-Transkriptionsprodukten

Tabelle 4A:

BglII-Fragment	Bande (in Abb. 10)	Subfragment (in Abb. 11)	MW (kb)	Position	Hybridisation[1]
1	1/5	1	5,4	95,9 - 90,5	-
	1/6	2 (= KpnI-4)	3,3	90,5 - 87,2	-
	1/2	3	14,0	87,2 - 73,2	-
	1/1	4 (= SalI-4)	15,4	73,2 - 57,8	++
	1/3	5	10,6	57,8 - 47,2	++
	1/4	6	7,8	47,2 - 39,4	-
2b	2ab,3,4/6	7	5,6	39,4 - 33,8	+
	2ab,3,4/3	8 (= SalI-5)	9,2	33,8 - 24,6	+
	2ab,3,4/8	9	2,6	24,6 - 22,0	+[2]
3	2ab,3,4/9	10	1,5	22,0 - 20,5	+[2]
	2ab,3,4/2	11	12,7	20,5 - 7,8	++
4	2ab,3,4/1		15,5	7,8 - 155,8	++
10			1,2	155,8 - 154,6	-
2a	2ab,3,4/7	12	3,84	154,6 - 150,76	-
	2ab,3,4/4	13 (= SalI-6)	7,17	150,76- 143,59	+
	2ab,3,4/5	14	6,39	143,59- 137,2	++
6			8,05	137,2 - 129,15	++
8b	8ab/2	15	3,15	129,15- 126,0	++
	8ab/3	16	1,1	126,0 - 124,9	+
7b	7ab/2	17	4,8	124,9 - 120,1	+
	7ab/3	18	0,65	120,1 - 119,45	-
7a	7ab/1		5,45	119,45- 114,0	-
5			10,6	114,0 - 103,4	-
9			3,3	103,4 - 100,1	-
8a	8ab/1		4,2	100,1 - 95,9	-

Tabelle 4B:

BglII-Fragment, -Subfragment	EcoRI-Fragment	MW (kb)	Position	Hybridisation[1]
1/1	T5	2,8	73,2 - 70,4	++
(= SalI-4)	40	0,55	70,4 - 69,85	+
	10	3,95	69,85- 65,9	+
	27	1,7	65,9 - 64,2	+
	24,26,39		64,2 - 59,8	(+)[3]
	T8	2,0	59,8 - 57,8	(++)[3]
1/3	T8	2,7	57,8 - 55,1	++
	34	1,1	55,1 - 54,0	++
	T1	6,8	54,0 - 47,2	++
3	T17	0,9	22,0 - 21,1	n.d.
	6	4,8	21,1 - 16,3	++
	37	0,8	16,3 - 15,5	++
	36	0,9	15,5 - 14,6	++
	18	2,75	14,6 - 11,85	++
	32	1,25	11,85- 10,6	++
	28	1,6	10,6 - 9,0	++
	T32	1,2	9,0 - 7,8	++
4	T32	0,05	7,8 - 7,75	n.d.
	38	0,7	7,75- 7,05	(++)[4]
	29	1,5	7,05- 5,55	++
	19	2,7	5,55- 2,85	++
	43	0,35	2,85- 2,5	n.d.
	9	4,15	2,5 -161,85	++
	36,37,38, 38,41,44		161,85 -158,0	(++)[4]
	T16	2,2	158,0 -155,8	-
2ab,3,4/4	14	3,25	150,75-147,5	+
(= SalI-6)	T9	3,91	147,5 -143,59	++[5]
2ab,3,4/5	T9	0,34	143,59-143,25	n.d.
	19	2,7	143,25-140,55	++
	38	0,7	140,55-139,85	+
	T17	2,65	139,85-137,2	+
6	T17	0,35	137,2 -136,85	n.d.
	27	1,7	136,85-135,15	+
	31	1,3	135,15-133,85	+
	21	2,2	133,85-131,65	++
	46	0,15	131,65-131,5	n.d.
	33	1,15	131,5 -130,35	++
	T15	1,2	130,35-129,15	++
8b/1	T15	1,95	129,15-127,2	++
	T29	1,2	127,2 -126,0	++

Tabelle 4B: Fortsetzung

BglII-Subfragment	EcoRI-Fragment	MW (kb)	Position	Hybridisation[1]
8b/2	T29	0,3	126,0 -125,7	
	42	0,45	125,7 -125,25	(++)[5)6)]
	T41	0,35	125,25-124,9	
7b/1	T41	0,15	124,9 -124,75	n.d.[5)]
	20	2,3	124,75-122,45	++
	T6	2,35	122,45-120,1	-

1) ++ starke Hybridisation, + Hybridisation, - keine Hybridisation, n.d. Hybridisation nicht bestimmt.

2) Die Hybridisation dises Fragments ist bei längerer Expositionszeit deutlich zu erkennen.

3) Der SalI-4 Terminus des Fragments EcoRI-8 wandert im Gel zusammen mit dem Fragment EcoRI-24. Da EcoRI-24 aber deutlich schwächer hybridisiert als EcoRI-8 (s. Abb. 10, Kanal 6), kann die starke Hybridisation dieser Bande dem EcoRI-8-Fragment zugeschrieben werden.

4) Die nicht kartierten BglII-EcoRI-Subfragmente 36 bis 39 und das kartierte EcoRI-38-Fragment liegen in Agarosegelen dicht beieinander. Es konnte nicht unterschieden werden, welche dieser Fragmente zu der beobachteten starken Hybridisation beitragen.

5) Diese EcoRI-Subfragmente hybridisieren stärker als die unter gleichen Bedingungen untersuchten, mit "+" gekennzeichneten EcoRI-Subfragmente. Die Hybridisationsrate wurde jedoch nicht direkt mit der der BglII-Subfragmente bzw. BglII-Fragmente verglichen.

6) Diese drei EcoRI-Subfragmente ließen sich in den verwendeten 1%-Agarosegelen nicht hinreichend trennen, um zwischen ihnen unterscheiden zu können.

Abbildung 11 faßt die bisher beschriebenen Hybridisationsergebnisse zusammen und zeigt, daß zwei dieser Regionen, die nicht mit in vitro-RNA hybridisieren, in den Bereichen des T4-Genoms liegen, die erst spät im Infektionsverlauf transkribiert werden. Damit konnte bestätigt werden, daß späte Gene in vitro nicht von der nicht modifizierten RNA-Polymerase aus *E.coli* transkribiert werden.

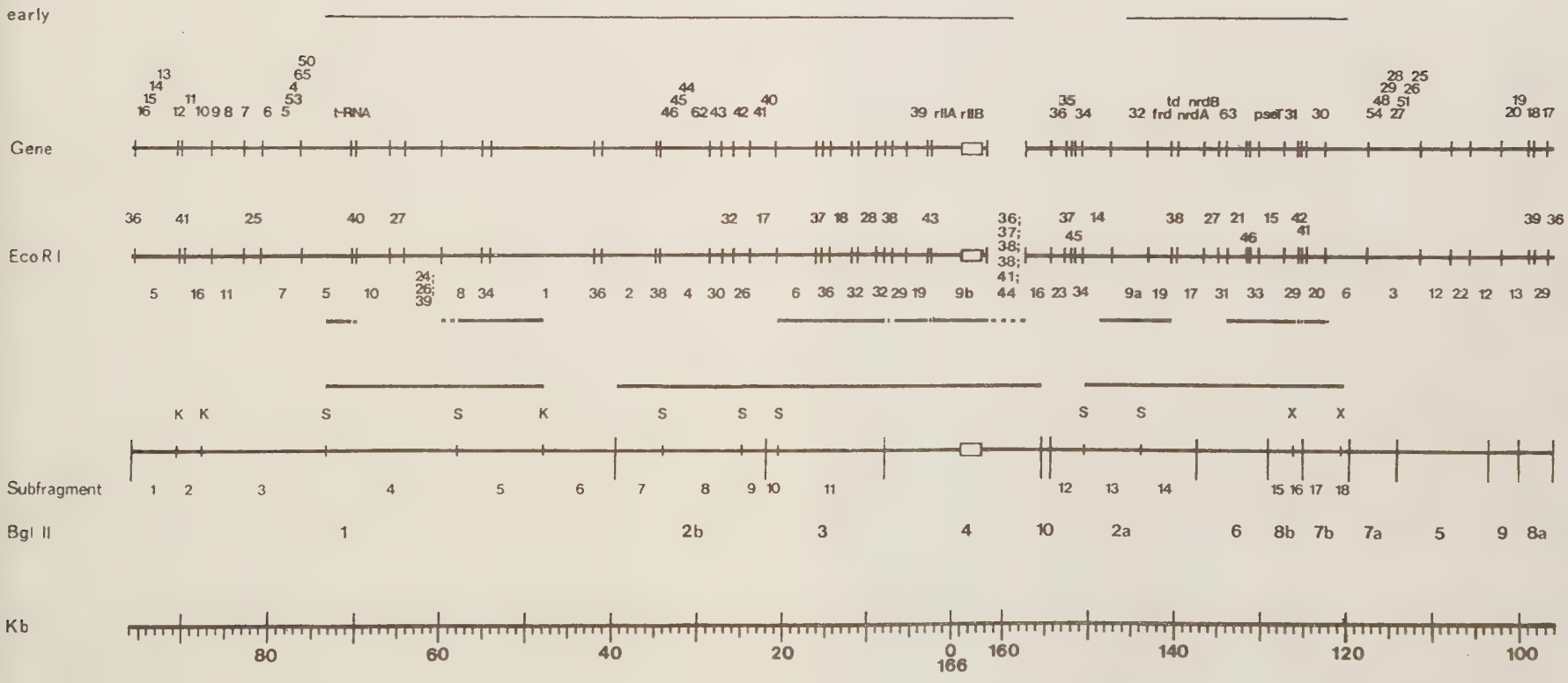
Frühe Gene liegen auf den Restriktionsfragmenten zwischen 73,2 kb und 158 kb sowie zwischen 148,7 kb und 122,45 kb (s. Abb. 11). Diese Restriktionsfragmente hybridisieren jedoch unterschiedlich stark mit in vitro synthetisierter RNA. Besonders stark hybridisieren die Restriktionsfragmente, die in den Bereichen 73,2 kb bis 70,4 kb, 59,8 kb bis 47,2 kb, 21,1 kb bis etwa 158 kb, 148,7 kb bis 140,55 kb und 133,85 kb bis 122,45 kb liegen. Das weist auf eine hohe Kopiezahl der diesen Regionen homologen Transkripte und damit auf eine häufige Transkriptionsinitiation in diesen Regionen in vitro hin.

Die dazwischenliegenden Bereiche früher Gene (69,8 kb bis 59,8 kb, 47,2 kb bis 21,1 kb und 140,55 kb bis 133,85 kb) werden dagegen unter den genannten Bedingungen (s. 2.9.) selten oder gar nicht transkribiert, da die entsprechenden Restriktionsfragmente nur schwach mit der eingesetzten RNA hybridisieren.

Es ist daher anzunehmen, daß innerhalb der stark hybridisierenden Fragmente oder in unmittelbarer Nachbarschaft dazu starke, frühe Promotoren des Phagen T4 vorhanden sind, deren Affinität zu der RNA-Polymerase aus E.coli höher ist als die solcher Promotoren, die in den Bereichen liegen, die schwach mit in vitro-Transkripten hybridisieren.

Zur Kartierung dieser starken Promotoren, die vermutlich den frühen Promotoren in vivo entsprechen (vgl. 1.4.), reichen jedoch Hybridisationsergebnisse nicht aus. Zusammen mit Transkriptionsuntersuchungen an isolierten Restriktionsfragmenten sind sie dagegen, wie das folgende Kapitel zeigt, geeignet, starke in vitro-Promotoren des Phagen T4 zu lokalisieren.

Abbildung 11: In vitro transkribierte Bereiche der T4-DNA.
Die Skala gibt in kb die Position der Restriktionsfragmente an. Der untere Bereich zeigt die BglII-Fragmente und -Subfragmente, der obere Bereich die EcoRI-Fragmente. Die Linien über den BglII-Subfragmenten zeigen die Regionen, die Sequenzhomologien zu in vitro synthetisierter RNA haben, Linien unter den EcoRI-Fragmenten geben an, welche Fragmente besonders stark mit in vitro-RNA hybridisieren. Unterbrechungen der Linien weisen auf Bereiche hin, deren Hybridisationsverhalten nicht eindeutig geklärt werden konnte (vgl. Tab. 4B). Im oberen Teil der Abbildung sind zum einen die Gene angegeben, die bislang mit EcoRI-Fragmenten korreliert wurden (vgl. Tab. 9), zum andern die Bereiche, die als Regionen früher Transkription angesehen werden (vgl. Wood & Revel, 1976).



3.4. Kartierung einer in vitro-Transkriptionseinheit

3.4.1. Hybridisation von Restriktionsfragmenten mit dem UpC-Transkript der T4 Wildtyp-DNA

Werden in vitro-Transkriptionsprodukte der T4 Wildtyp-DNA in gemischten Polyacrylamid-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, so ergeben sich im Autoradiogramm etwa 30 Banden. Einige dieser Transkripte lassen sich in Gegenwart eines Dinukleotids und eines zusätzlichen Ribonukleosidtriphosphats selektiv initiieren (Rüger, 1978). Es bilden sich vermutlich stabile ternäre Komplexe zwischen der DNA, der RNA-Polymerase und dem Oligonukleotid. Zusätzliche, weniger stabile Komplexe dissoziieren in Gegenwart von Kompetitor-Nukleinsäure während der 30minütigen Inkubation bei 0°C, so daß die anschließende Synthesephase nach Zugabe der drei fehlenden Ribonukleosidtriphosphate nur bei den stabil initiierten Transkriptionskomplexen zu einer Kettenverlängerung führt.

Eines dieser Transkripte hat eine Kettenlänge von etwa 4200 Nukleotiden und läßt sich besonders effektiv in Gegenwart von UpC und UTP initiieren. Zur Kartierung dieser sog. UpC-Transkriptionseinheit wurden zunächst DNA:RNA-Hybridisationen durchgeführt. Abbildung 12, Kanal 1, zeigt, daß das ^{14}C-markierte UpC-Transkript mit dem viertgrößten Subfragment hybridisiert, das nach Restriktion der BglII-Fragmente 2ab, 3 und 4 mit SalI entsteht. Dieses Subfragment entspricht dem Fragment SalI-6 (s. Tab. 4A).

Das Fragment SalI-6 und das auf der rechten Seite benachbart liegende SalI-Subfragment des BglII-Fragments BglII-2a (BglII-2ab,3,4/5, s. Tab. 4A) wurden aus präparativen Agarosegelen isoliert, mit EcoRI geschnitten und ebenfalls durch Hybridisation an Southern-Filtern

untersucht. Abbildung 12, Kanal 2, zeigt, daß vor allem der EcoRI-9a-Terminus des Fragments SalI-6 hybridisiert; etwas geringere Hybridisation zeigt das Fragment EcoRI-14, das ebenfalls aus SalI-6 entsteht. Die EcoRI-Subfragmente des Nachbarfragments (vgl. Tab. 4B) zeigen keine Hybridisation. Das UpC-Transkript zeigt also Sequenzhomologie zu den Fragmenten SalI-6 und - besonders deutlich - EcoRI-9a.

Zur genaueren Lokalisation des DNA-Abschnitts, der mit dem UpC-Transkript hybridisiert, wurde eine Restriktionskarte des Fragments SalI-6 bzw. der EcoRI-Fragmente EcoRI-9a und -14 aufgestellt. Die Restriktionsschnitte wurden mit den in Kapitel 2.14. beschriebenen Methoden kartiert.

Abbildung 14 - als Faltkarte am Ende des Kapitels 3.4.2. - und Tabelle 5 zeigen die Positionen der ClaI-, HpaII-, HindIII- und einiger HinfI-Schnitte innerhalb der Fragmente SalI-6 und EcoRI-9a und -14. Abbildung 14 zeigt darüber hinaus Genorte und Transkriptionsdaten, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

Mit Hilfe der ClaI-, HpaII- und HindIII-Schnitte wurde der Bereich des SalI-6-Fragments, der mit dem UpC-Transkript hybridisiert, enger eingegrenzt. Die isolierten Restriktionsfragmente SalI-6 und EcoRI-9ab wurden mit HpaII geschnitten, SalI-6 wurde außerdem mit ClaI geschnitten, die drei größten SalI-6-ClaI-Subfragmente mit 3,6 kb, 2,26 kb und 1,15 kb wurden aus präparativen Agarosegelen isoliert und entweder mit HpaII oder mit HindIII geschnitten. Diese HpaII- und HindIII-Subfragmente wurden elektrophoretisch getrennt und an Nitrozellulosefilter gebunden, die Filter wurden wiederum zur Hybridisation mit dem UpC-Transkript eingesetzt.

Abbildung 12 zeigt Autoradiogramme der Hybridisationsfilter, Tabelle 6 faßt die Auswertung der Hybridisationen zusammen.

Tabelle 5: Restriktionsschnitte im Bereich der Fragmente SalI-6 und EcoRI-9a

Restriktions-endonuklease	Bezeichnung in Abb. 14	Distanz zum SalI-Schnitt bei 150,76 kb	Position (kb)
SalI	S 8	0	150,76
EcoRI	E 60	0,01 kb	150,75
ClaI	Cla	0,16 kb	150,6
HindIII	Hi	0,46 kb	150,3
HindIII	Hi	1,11 kb	149,65
ClaI	Cla	1,31 kb	149,45
SmaI/HpaII	Sm/Hp	2,06 kb	148,7
HinfI	Hif	2,21 kb	148,55
HinfI	Hif	2,23/2,24 kb	148,53/148,52
HinfI	Hif	2,26 kb	148,5
HindIII	Hi	2,51 kb	148,25
HinfI	Hif	2,61 kb	148,15
HinfI	Hif	2,81 kb	147,95
HinfI	Hif	2,93 kb	147,83
HpaII	Hp	3,14 kb	147,62
EcoRI	E 59	3,26 kb	147,5
HpaII	Hp	3,41 kb	147,35
HpaII/HindIII	Hp/Hi	3,46 kb	147,3
HpaII	Hp	4,51 kb	146,25
HpaII	Hp	4,76 kb	146,0
ClaI	Cla	4,91 kb	145,85
HindIII	Hi	5,99 kb	144,77
HindIII	Hi	6,83 kb	143,93
SalI	S 7	7,17 kb	143,59
EcoRI	E 58	7,51 kb	143,25

HinfI-Schnitte wurden nur zwischen dem HpaII/SmaI-Schnitt bei 148,7 kb und dem EcoRI-Schnitt bei 147,5 kb kartiert. Die Lage eines HinfI-Schnitts in diesem Bereich (148,53/148,52) konnte nicht entschieden werden.
Die Lage und Größe der drei häufig im Text genannten ClaI-Subfragmente des Fragments SalI-6 können wie folgt der Tabelle 5 entnommen werden:
ClaI-1 : 3,6 kb, 149,45 kb bis 145,85 kb
ClaI-2 : 2,26 kb, 145,85 kb bis 143,59 kb
ClaI-3 : 1,15 kb, 150,6 kb bis 149,45 kb
Das als EcoRI-14-ClaI-1 bezeichnete Subfragment liegt zwischen 149,45 kb und 147,5 kb und hat ein Molekulargewicht von 1,95 kb.

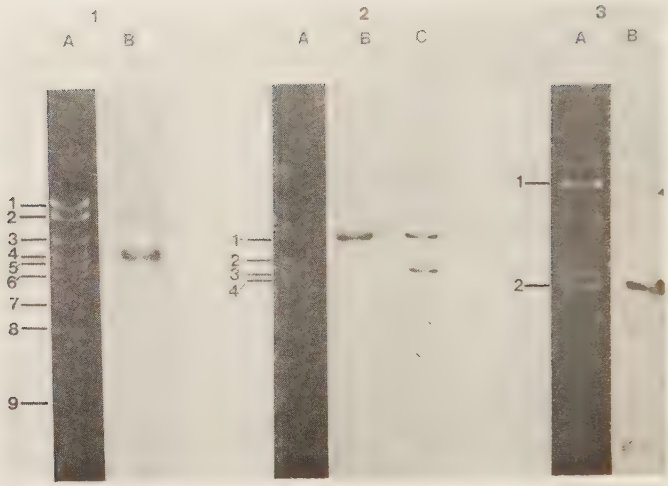


Abbildung 12: Hybridisation von Restriktionsfragmenten der saΔ9-DNA mit dem UpC-Transkript. Die Abbildung zeigt 0,8%- (1), 1%- (2) bzw. 2%- (3-10) Agarosegele (A) und die entsprechenden Autoradiogramme (B) nach Hybridisation mit dem UpC-Transkript. Kanal 2C zeigt als Vergleich das Autoradiogramm einer Hybridisation mit unter Standardbedingungen synthetisierten Transkripten. Die einzelnen Kanäle zeigen: BglII-2ab,3,4 x SalI (1) BglII-2ab,3,4/4 (= SalI-6) und BglII-2ab,3,4 /5 x EcoRI (2), EcoRI-9ab x HpaII (3), SalI-6 x HpaII (4), SalI-6-ClaI-1 x HpaII (5), SalI-6-ClaI-2 x HpaII (6), SalI-6-ClaI-3 x HpaII (7), fd x HpaII (8), T4 saΔ9-DNA x EcoRI (9), SalI-6-ClaI-1 x HindIII (10), SalI-6-ClaI-2 x HindIII (11), SalI-6 -ClaI-3 x HindIII (12).

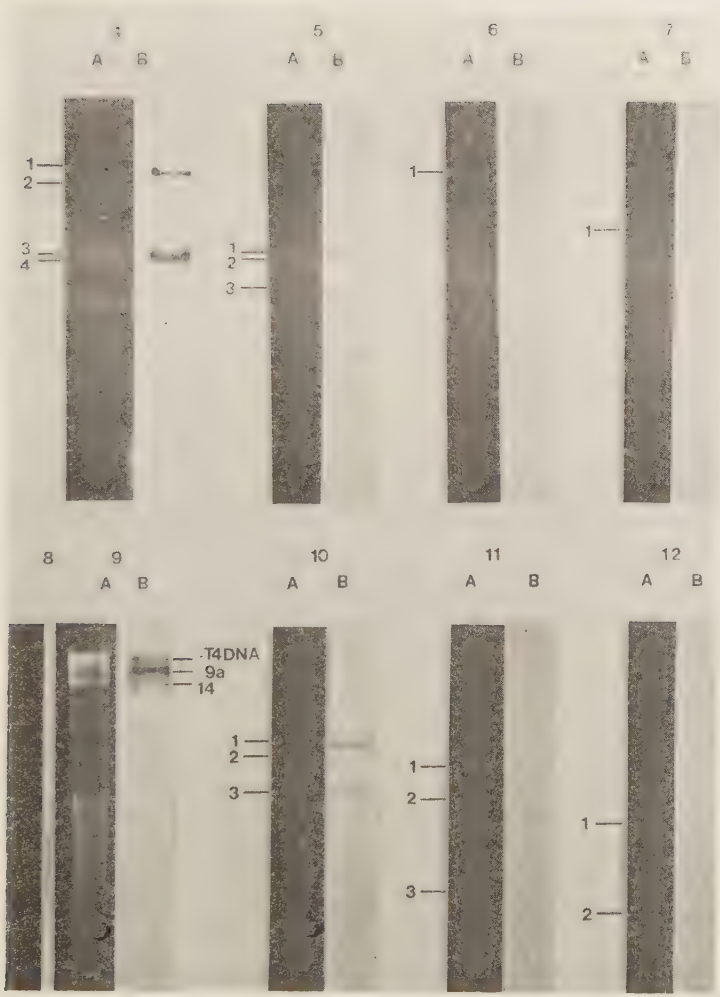


Abbildung 12:

Tabelle 6: Hybridisation von SalI-6- und EcoRI-9a-Subfragmenten mit dem UpC-Transkript

Fragment	Enzym	Bande[1]	Position (kb)	MW (bp)	Hyb.[2]
SalI-6	HpaII	2	150,76-148,7	2060	-
		3	148,7 -147,62	1080	+
		5	147,62-147,35	270	n.d.
		7	147,35-147,3	50	n.d.
		4	147,3 -146,25	1050	+
		6	146,25-146,0	250	n.d.
		1	146,0 -143,59	2410	+
EcoRI-9a	HpaII	4	147,5 -147,35	150	n.d.
		5	147,35-147,3	50	n.d.
		2	147,3 -146,25	1050	+
		3	146,25-146,0	250	n.d.
		1	146,0 -143,25	2750	+
SalI-6-ClaI-3	HpaII	1	150,6 -149,45	1150	-
SalI-6-ClaI-1	HpaII	3	149,45-148,7	750	-
		1	148,7 -147,62	1080	+
		4	147,62-147,35	270	n.d.
		7	147,35-147,3	50	n.d.
		2	147,3 -146,25	1050	+
		5	146,25-146,0	250	n.d.
		6	146,0 -145,85	150	n.d.
SalI-6-ClaI-2	HpaII	1	145,85-143,59	2260	+
SalI-6-ClaI-3	HindIII	2	150,6 -150,3	300	-
		1	150,3 -149,65	650	-
		3	149,65-149,45	200	n.d.
SalI-6-ClaI-1	HindIII	2	149,45-148,25	1400	-
		3	148,25-147,3	950	+
		1	147,3 -145,85	1450	+
SalI-6-ClaI-2	HindIII	1	145,85-144,77	1080	+
		2	144,77-143,93	840	-
		3	143,93-143,59	340	-

1) Bandennummer in Abbildung 12

2) Hybridisation (+), keine Hybridisation (-), Hybridisation nicht bestimmt (n.d.)

Die Bezeichnung der Subfragmente erfolgte analog zu der der Restriktionsfragmente (vgl. Tab. 3). So bedeutet z.B. SalI-6-ClaI-1, daß es sich um das größte der Subfragmente handelt, die nach Restriktion mit ClaI aus SalI-6 entstehen.

Das etwa 4200 Nukleotide lange UpC-Transkript hybridisiert mit Fragmenten, die zwischen 148,7 kb (SmaI/HpaII-Schnitt) und 144,77 kb (HindIII-Schnitt), d.h. in einem 3,93 kb langem Bereich liegen. Die Transkription früher Gene des Phagen T4 verläuft gegen den Uhrzeigersinn auf der zirkulären Genkarte (s. Abb. 2), d.h. von links nach rechts auf den in dieser Arbeit abgebildeten physikalischen Karten. Die Hybridisationsergebnisse lassen also vermuten, daß der Promotor des UpC-Transkripts etwa bei 148,7 kb, d.h. am rechten Ende des Fragments EcoRI-14 liegt und daß hauptsächlich an EcoRI-9a transkribiert wird.

3.4.2. Kartierung zweier Promotoren auf T4 dC-DNA

Zur Kartierung des UpC-Promotors und -Terminators wurden die Fragmente SalI-6, SmaI-2 und EcoRI-9a sowie die ClaI-Subfragmente von SalI-6 und EcoRI-14 isoliert und in vitro sowohl unter Standardbedingungen als auch nach Initiation in Gegenwart von UpC und UTP transkribiert.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. An SmaI-2 und SalI-6, die sich zum Teil überlappen (s. Abb. 21), werden in vitro fünf bzw. drei Transkripte abgelesen, deren Kettenlängen mit 4200, 3000, 2500, 1900 und 1000 Nukleotiden (SmaI-2) bzw. 4200, 1000 und 400 Nukleotiden (SalI-6) bestimmt wurden. Unter Initiationsbedingungen in Gegenwart von UpC und UTP wird jeweils nur das 4200 Nukleotide lange Transkript synthetisiert (Abb. 13, Kanal 3 bis 6). Die Transkription der SalI-6- bzw. EcoRI-14-ClaI-Subfragmente zeigt, daß das 2650 Nukleotide lange Transkript des SalI-6-ClaI-1-Subfragments (3,6 kb, s. Tab. 5) und das 1000 Nukleotide lange Transkript des EcoRI-14-ClaI-1-Subfragments (1,95 kb, s. Tab. 5) in Gegenwart von UpC und UTP initiiert werden kann (Abb. 13, Kanal 9 bis 12).

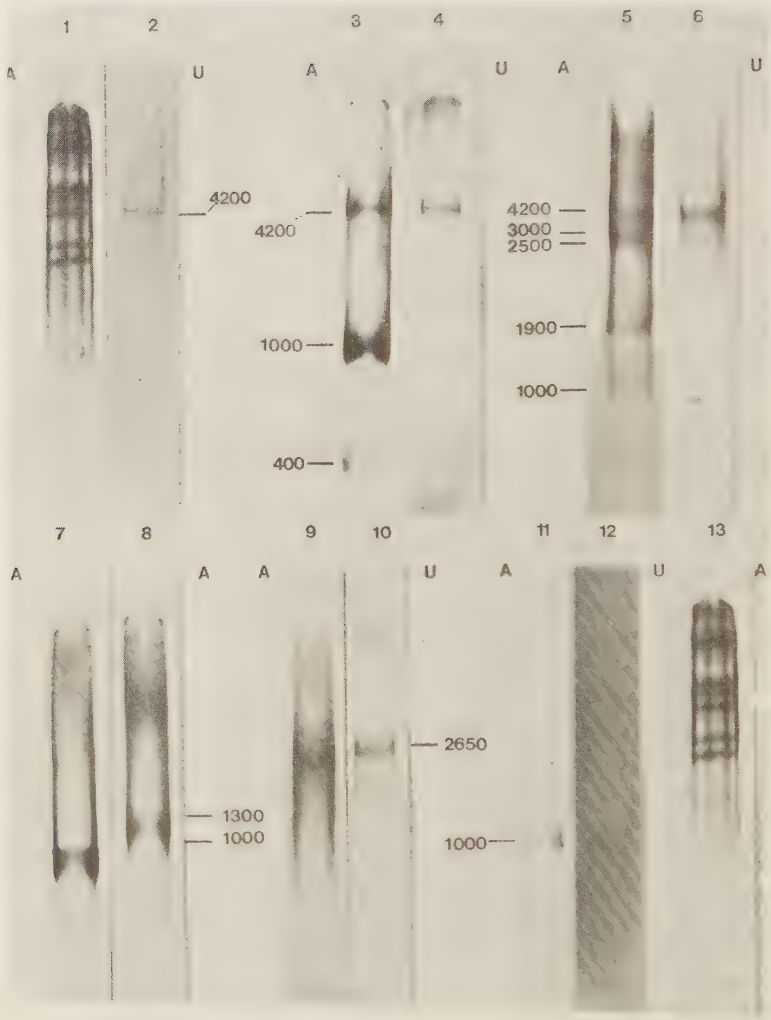


Abbildung 13:

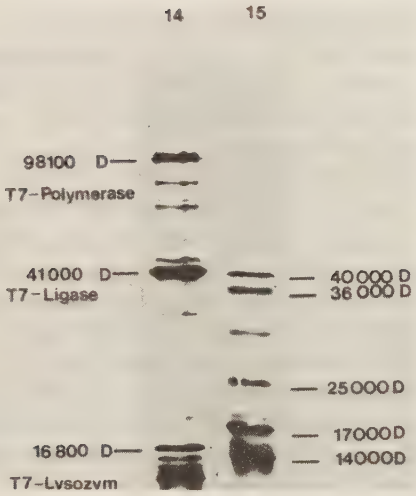


Abbildung 13: Autoradiographie elektrophoretisch getrennter in vitro-Transkriptions- und -Translationsprodukte. Die Autoradiogramme wurden verschiedenen Versuchsreihen entnommen, die Molekulargewichte wurden jeweils durch Vergleich mit T4 Wildtyp-DNA-Transkripten bestimmt. Die einzelnen Kanäle zeigen die Transkripte an: T4 Wildtyp-DNA (1, 2, 13), SalI-6 (3, 4), SmaI-2 (5, 6), SalI-6-ClaI-2 (7), EcoRI-9a (8), SalI-6-ClaI-1 (9, 10), EcoRI-14-ClaI-1 (11, 12). Die Kanäle mit der Bezeichnung "A" zeigen Transkriptionsprodukte, die unter Standardbedingungen synthetisiert wurden, "U" kennzeichnet solche aus UpC-Initiationsansätzen.
Die Kanäle 14 und 15 zeigen Autoradiogramme eines Proteingels. Kanal 14 zeigt Molekulargewichtsmarker, Kanal 15 die in vitro-Translationsprodukte des Fragments SalI-6. Die gekoppelte in vitro-Transkription-Translation wurde in Zusammenarbeit mit Prof. E. Fuchs (Heidelberg)und H.Gram (Bochum) durchgeführt.

Da der ClaI-Schnitt bei 149,45 kb, der beiden ClaI-Subfragmenten gemeinsam ist, außerhalb des Fragments SmaI-2 liegt, das seinerseits jedoch als DNA-Matrize für das vollständige UpC-Transkript dienen kann, muß die Verkürzung der ClaI-Subfragment-Transkripte durch den ClaI-Schnitt bei 145,85 kb bzw. den EcoRI-Schnitt bei 147,5 kb erfolgen (vgl. Abb. 14 am Ende dieses Kapitels).

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, daß die Transkription des UpC-Transkripts von einem Punkt nahe dem SmaI-2-Schnitt bei 148,7 kb in Richtung auf den EcoRI-Schnitt bei 147,5 kb, den ClaI-Schnitt bei 145,85 kb und noch darüber hinaus verläuft, was der erwarteten frühen Transkriptionsrichtung von links nach rechts auf den in dieser Arbeit abgebildeten Karten entspricht (vgl. 3.4.1.).

Zum andern läßt sich der UpC-Promotor auf Grund der verkürzten Transkriptlängen 2650 bp vor dem ClaI-Schnitt bei 145,85 kb bzw. 1000 bp vor dem EcoRI-Schnitt bei 147,5 kb, d.h. also bei 148,5 kb kartieren. Der Transkriptlänge von 4200 Nukleotiden entsprechend liegt der Terminator bei 144,3 kb.

Die in Tabelle 6 zusammengestellten Hybridisationsergebnisse ergeben jedoch eine Termination des UpC-Transkripts bereits in der Nähe des HindIII-Schnitts bei 144,77 kb, was durch die Lage eines starken Promotors bei 144,59 kb unterstützt wird: SalI-6 trägt am - auf Abbildung 14 bezogen - rechten Ende einen Teil des frd-Gens, der in vitro mit der gleichen Transkriptionsrichtung wie das UpC-Transkript abgelesen wird (Hänggi & Zachau, 1980). Dieser Teil des frd-Gens wird auch unter den als Standardbedingungen beschriebenen (s. 2.9.) Verhältnissen abgelesen, wie die Transkription einer 1000 Nukleotide langen RNA an SalI-6 und dem dem rechten (s.o.) SalI-6-Ende entsprechenden SalI-6-ClaI-2-Subfragment bzw. einer 1300 Nukleotide langen RNA an EcoRI-9a zeigt (s. Abb. 13, Kanal 3, 7 und 8):

Das EcoRI-9a-Transkript ist ein um etwa 300 Nukleotide längeres Transkript als das des SalI-6-ClaI-2-Subfragments. Ein Vergleich mit den Restriktionsdaten der

Tabelle 5 zeigt, daß dieser Unterschied in den Transkriptlängen darauf beruht, daß die RNA jeweils 1000 Nukleotide vor dem SalI-Schnitt, d.h. bei 144,59 kb, initiiert wird. Im Fall des SalI-6-ClaI-2-Subfragments wird demnach die Transkription vorzeitig bei 143,59 kb abgebrochen (im folgenden auch als "run off" bezeichnet), während im Fall des EcoRI-9a-Fragments eine um 340 Nukleotide längere RNA synthetisiert werden kann, da das Fragment bis 143,25 kb reicht (vgl. Abb. 14). Diese Ergebnisse erlauben die Kartierung eines - der Intensität der RNA-Bande im Autoradiogramm entsprechend - starken frd-Promotors bei 144,59 kb.

Die Lage des starken frd-Promotors bei 144,59 kb und die Hybridisationsergebnisse des Kapitels 3.4.1. weisen auf eine Termination des UpC-Transkripts zwischen 144,77 kb und 144,59 kb hin. Der Terminator liegt daher vermutlich bei 144,6 kb, was für das UpC-Transkript eine Kettenlänge von 3900 an Stelle der ursprünglich angenommenen 4200 Nukleotide bedeutet. Die Molekulargewichtsbestimmungen wurden in SDS-Gelen durchgeführt, in denen RNA nicht vollständig denaturiert vorliegt. Vor allem bei Transkripten mit großen Kettenlängen kann es daher zu Abweichungen zwischen dem experimentell bestimmten und dem tatsächlichen Molekulargewicht kommen. Eine Überschätzung des Molekulargewichts im Fall des UpC-Transkripts liegt daher im Rahmen der methodisch bedingten Meßgenauigkeit.

Ein Vergleich mit Klonierungsdaten von Krisch & Selzer (1981) zeigt, daß der UpC-Promotor 1100 bp vor dem Gen 33 und der Terminator etwa 350 bp nach dem Gen 32 liegt (vgl. Abb. 14).

In Zusammenarbeit mit Prof. Fuchs (Heidelberg) und H. Gram (Bochum) wurde das Fragment SalI-6 in einem gekoppelten in vitro-Transkriptions-Translationssystem (Fuchs, 1976) untersucht. Abbildung 13 (Kanal 14 und 15) zeigt die fünf SalI-6-spezifischen in vitro-Translations-

produkte. In dem Bereich des T4-Genoms, in dem das Fragment SalI-6 liegt, wurden vier frühe Gene: 33, 59, 32 und ein Teil des frd-Gens kartiert. Hercules & Wiberg (1971) haben vermutet, daß zwischen den Genen 34 und 33 ein weiteres frühes Gen des Phagen: das (= suα) liegt. (vgl. Abb. 14). Die Synthese von fünf SalI-6-spezifischen in vitro-Translationsprodukten kann daher als Hinweis darauf gewertet werden, daß eines der fünf in vitro synthetisierten Proteine das Genprodukt des das-Gens ist (vgl. 4.2.).

Ein drittes SalI-6-spezifisches in vitro-Transkriptionsprodukt, dessen Länge mit 400 Nukleotiden bestimmt wurde (s. Abb. 13, Kanal 3), ist vermutlich ein weiteres vorzeitig abgebrochenes frd-Transkript, das an einem schwächeren Promotor bei 143,99 kb initiiert wird. Diese RNA wurde jedoch nicht reproduzierbar synthetisiert, so daß dieser zweite frd-Promotor ebenso wie die Terminatoren der frd-Transkripte nicht eindeutig kartiert werden konnten (s. 4.2.).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es mit Hilfe detaillierter Restriktionskarten, DNA:RNA-Hybridisationen und in vitro-Transkription an isolierten Restriktionsfragmenten möglich war, einen in Gegenwart von UpC und UTP initiierbaren, starken in vitro-T4-Promotor bei 148,5 kb zu kartieren und durch Nachweis der Transkriptionsrichtung das etwa 3900 Nukleotide lange Transkript den Genen 33, 59 und 32 zuzuordnen. Der Abstand von 1100 bp zwischen dem Promotor und dem Gen 33 sowie die Synthese eines zusätzlichen, fünften Proteins in einem gekoppelten in vitro-Transkriptions-Translationssystem deuten darauf hin, daß der UpC-Promotor nicht der Promotor des Gens 33, sondern eines zusätzlichen frühen Gens ist, das der Mutationsklasse das entspricht.

Ein weiterer starker Promotor der T4 dC-DNA, der Promotor des frd-Gens, wurde bei 144,59 kb kartiert.

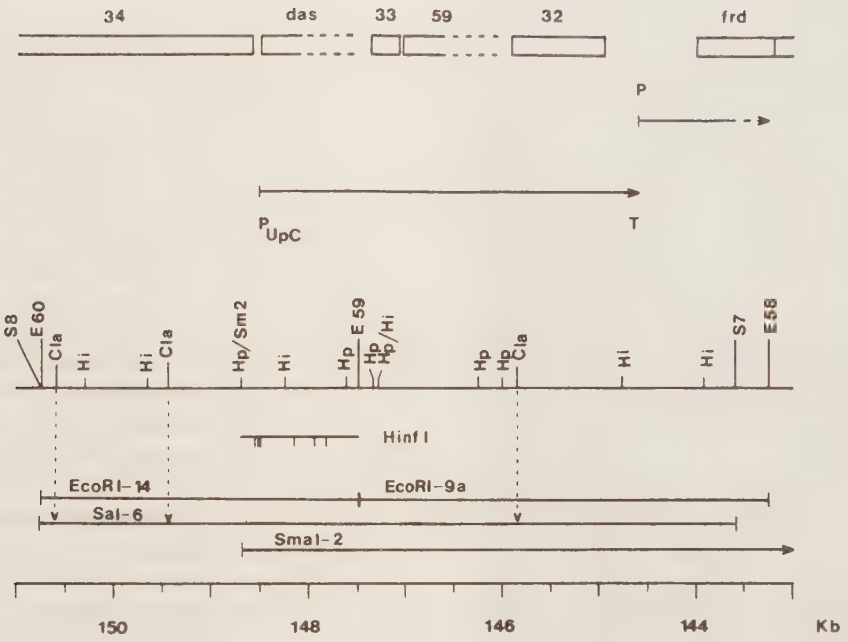


Abbildung 14: Kartierung des UpC-Transkripts.
Die untere Skala gibt in kb den Abstand der Schnitte zum genetischen Nullpunkt an. Die Symbole für die Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 5 erläutert. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der UpC-Transkriptionseinheit (P = Promotor, T = Terminator) und die des starken frd-Transkripts an. Genorte wurden durch Vergleich mit Daten anderer Autoren (Revel, 1981, Krisch & Selzer, 1981, Hänggi & Zachau, 1980) zugeordnet.

3.5. Versuche zur Klonierung und Sequenzierung eines frühen Promotors des Phagen T4

Zur Klonierung des UpC-Promotors wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Versuche unternommen, die entsprechenden DNA-Fragmente (s. 3.4.) in die DNA des Phagen λφ607 und des Plasmids pBR322 zu integrieren.

EcoRI-Fragmente der T4 dC-DNA wurden mit EcoRI-geschnittener λφ607-DNA durch T4-Ligase verbunden und in E.coli C600-Sphäroplasten transformiert. Die Selektion der T4-λφ607-Hybridphagen erfolgte über deren Klarplaque-Phänotyp (s. 2.11.3.). Die Klonanalyse wurde mit Hilfe von Restriktionsanalysen und DNA:RNA-Hybridisationen zwischen der filtergebundenen DNA der Hybridphagen und dem ^{14}C-markierten UpC-Transkript durchgeführt.

Außerdem wurden T4-HindIII-Fragmente bzw. die HindIII Subfragmente des Fragments SalI-6 in die HindIII-Restriktionsstelle des Plasmids pBR322 integriert. Hybridplasmide ließen sich auf Grund der neu auftretenden Tetracyclin-Sensibilität selektionieren (s. 2.11.4.). Die DNA dieser Hybridplasmide wurde durch Restriktionsanalyse untersucht.

Es ließen sich jedoch keine Hybridplasmide oder -phagen isolieren, die den UpC-Promotor enthielten. Der UpC-Promotor ist - zumindest in vitro - ein starker Promotor. Das negative Ergebnis der Klonierungsversuche wird im Zusammenhang mit dem generellen Problem der Klonierung starker Promotoren virulenter Bakteriophagen in Kapitel 4.3. diskutiert.

Es konnte jedoch ein anderer früher Promotor des Phagen T4 durch DNA-Sequenzierung untersucht werden, der in pEN88, einem der zahlreichen pBR322-Hybridplasmide, enthalten ist. Das Plasmid pEN88 weist neben der pBR322-DNA drei T4-spezifische HindIII-Fragmente auf: 1,9 kb, 1,2 kb und 0,8 kb (s. Abb. 15, Kanal 1).

Zur Identifikation des Bereichs der T4-DNA, dem diese HindIII-Fragmente entsprechen, wurden DNA:DNA-

Hybridisationen zwischen pEN88-DNA und Restriktionsfragmenten der T4 dC-DNA durchgeführt: An Nitrozellulosefilter gebundene XhoI-Restriktionsfragmente der T4 dC-DNA wurden unter Hybridisationsbedingungen mit den T4-spezifischen HindIII-Fragmenten der pEN88-DNA inkubiert, die durch "Nick Translation" mit ^{32}P radioaktiv markiert worden waren. Das Autoradiogramm der Abbildung 15 (Kanal 7) zeigt, daß Hybridisation nur mit XhoI-10 erfolgt, d.h. daß die klonierte DNA einem Teil des XhoI-10-Fragments entspricht. Die Kartierung der EcoRI-Schnitte und eines BglII-Schnitts in dem T4-spezifischen Teil der pEN88-DNA ergab, daß das Plasmid neben zwei Termini mit 300 bp und 350 bp die drei EcoRI-Fragmente 42, 41 und 20 enthält (s. Abb. 15, Kanal 2) und somit den Teil des XhoI-10-Fragments repräsentiert, der dem Bereich zwischen 126 kb und 122,1 kb der physikalischen Karte entspricht.

Die Kartierung der Restriktionsschnitte wurde mit den in Kapitel 2.14. beschriebenen Methoden durchgeführt. Abbildung 17 (Faltkarte am Ende dieses Kapitels) zeigt schematisch die Restriktionskarte des T4-spezifischen Teils der pEN88-DNA sowie genetische Daten dieses Abschnitts des T4-Genoms. Tabelle 7 gibt die Positionen der HindIII-, EcoRI-, ClaI- und BglII-Schnittstellen bezogen auf T4 dC-DNA an.

Es wurde versucht, die Orientierung der T4-spezifischen HindIII-Fragmente im Plasmid durch Restriktionsanalyse der pEN88-DNA mit EcoRI festzustellen. Der EcoRI-Schnitt und der HindIII-Schnitt der pBR322-DNA liegen in einem Abstand von 31 bp zueinander.(Sutcliffe, 1978). Die beiden EcoRI-Termini der klonierten DNA wurden mit 300 bzw. 350 bp bestimmt (s. Abb. 17). Je nach Orientierung der HindIII-Fragmente zur pBR322-DNA sind daher nach Restriktion der pEN88-DNA mit EcoRI in einem Fall eine um den 300 bp langen Terminus vergrößerte pBR322-DNA mit 4630 bp und ein um die 31 bp-Distanz zwischen dem HindIII-Schnitt und dem EcoRI-Schnitt der pBR322-DNA vergrößerter 350 bp-Terminus mit 381 bp zu erwarten.

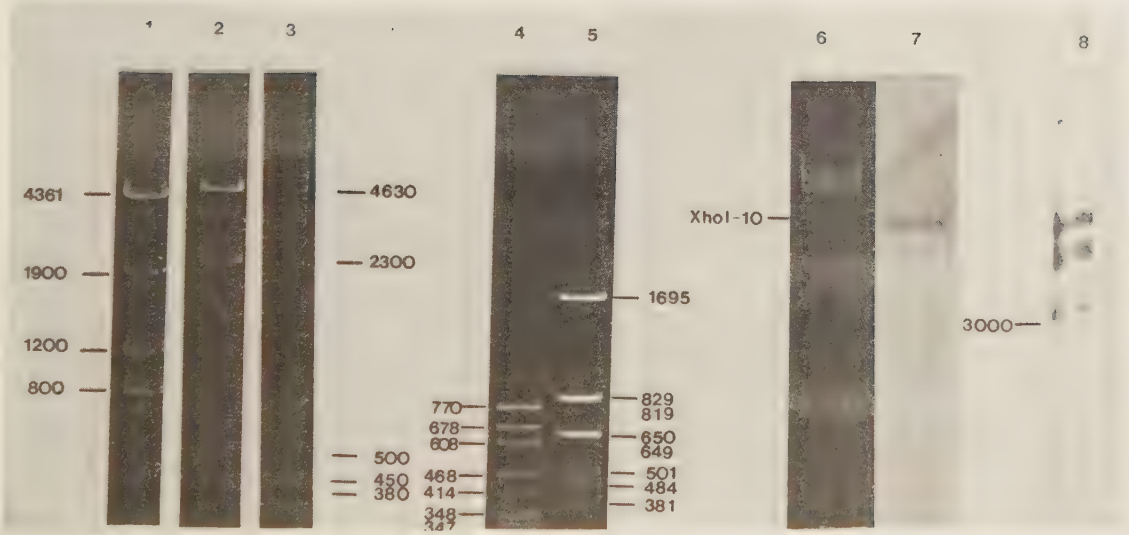


Abbildung 15:

Tabelle 7: HindIII-, EcoRI-, ClaI- und BglII-Schnitte in pEN88-DNA

Enzym	Bezeichnung in Abb. 17	Distanz zum HindIII-Schnitt bei 126 kb (bp)	Position [1] (kb)
HindIII	Hi	0	126,0
EcoRI	E 48	300	125,7
EcoRI	E 47	750	125,25
BglII	B 9	1070	124,93
EcoRI	E 46	1250	124,75
ClaI	Cla	1600	124,4
HindIII	Hi	1900	124,1
HindIII	Hi	3100	122,9
EcoRI	E 45	3550	122,45
HindIII	Hi	3900	122,1

1) Position des Restriktionsschnitts auf T4 dC-DNA.

Legende zu Abbildung 15: Charakterisierung der DNA des Klons pEN88.
1: pEN88-DNA x HindIII
2: pEN88-DNA x EcoRI
3: T4 saΔ9-DNA x EcoRI
4: fd-DNA x HinfI
5: fd-DNA x HpaII
6: T4 saΔ9-DNA x XhoI
7: Autoradiogramm der Hybridisation zwischen XhoI-Fragmenten der T4 saΔ9-DNA und ^{32}P-markierter pEN88-DNA
8: Autoradiogramm HaeII-5-spezifischer in vitro-Transkriptionsprodukte. Die in vitro Transkription wurde in Zusammenarbeit mit H. Gram (Bochum) durchgeführt.

Bei entgegengesetzter Orientierung würden ein 4680 bp und ein 331 bp langer EcoRI-Terminus entstehen. Die Molekulargewichte der pEN88-EcoRI-Fragmente (s. Abb. 15, Kanal 2) deuten darauf hin, daß die erste der beiden Möglichkeiten zutrifft, d.h. daß die T4-spezifischen HindIII-Fragmente in der Orientierung 0,8 kb - 1,2 kb - 1,9 kb (im Uhrzeigersinn) in die HindIII-Restriktionsstelle des Plasmids pBR322 integriert wurden.

Die EcoRI-Fragmente 20, 41 und 42 tragen das Gen 30, dessen Genprodukt die DNA-Ligase des Phagen ist (Wilson & Murray, 1979). Das T4-Ligase-Gen wird als typisches "immediate early" Gen in vitro transkribiert (Jayaraman, 1972), wie auch die Hybridisation des EcoRI-20-Fragments mit in vitro-Transkriptionsprodukten zeigt (vgl. 3.3.2.).

Das Restriktionsfragment HaeII-5 überlappt mit den Restriktionsfragmenten EcoRI - 20, -41 und -42 (vgl. Abb. 21 am Ende dieser Arbeit). Die in vitro-Transkriptionsprodukte des HaeII-5-Fragments wurden von Gram (1982) kartiert: Abbildung 15, Kanal 8 zeigt das Autoradiogramm der Transkripte. Das kleinste HaeII-5-Transkript mit etwa 3000 Nukleotiden Länge wird vom rechten Ende - bezogen auf die in dieser Arbeit abgebildeten Karten - des Fragments abgelesen. Es ist vermutlich ein sog. "run off"-Transkript, d.h. es wird nicht mehr innerhalb des Restriktionsfragments terminiert; es ist allerdings nicht auszuschließen, daß es sehr nahe am Ende des Fragments HaeII-5 terminiert wird. Der Startpunkt des Transkripts hat also einen Abstand von mindestens 3 kb zu dem HaeII-5-Schnitt bei 122 kb. Dementsprechend liegt der Promotor dieses Transkripts entweder bei 125 kb, d.h. zentral im EcoRI-41-Fragment im Fall eines "run off"-Transkripts oder, im Fall einer früheren Terminierung, in etwas größerer Distanz zu dem HaeII-Schnitt bei 122 kb, d.h. näher am EcoRI-42-Fragment. In beiden Fällen liegt er jedoch im EcoRI-41-Fragment (vgl. Abb. 17).

Da das EcoRI-41-Fragment im 1,9 kb-HindIII-Fragment der pEN88-DNA enthalten ist, wurde diese DNA als Ausgangsmaterial zur DNA-Sequenzierung der Region verwendet, in der in vitro die Transkription der T4-Ligase-Genregion initiiert wird.

Die DNA des Plasmids pEN88 wurde isoliert und mit HindIII geschnitten. Das 1,9 kb-HindIII-Fragment wurde aus präparativen Agarosegelen isoliert und mit EcoRI geschnitten. Die EcoRI-Subfragmente wurden jeweils an den 3'-Enden mit ^{32}P markiert, in 6%-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt und aus dem Gel isoliert. Die Trennung der markierten Enden erfolgte im Fall des 300 bp-Terminus und des EcoRI-42-Fragments durch Strangtrennung (s. 2.5.4.2.), das EcoRI-41-Fragment wurde mit BglII, der 650 bp-Terminus mit ClaI geschnitten (vgl. Abb. 17), die entstandenen Subfragmente wurden in 6%-Polyacrylamidgelen getrennt. Die Einzelstränge und Subfragmente wurden autoradiographisch nachgewiesen (s. Abb. 16, A, B, D und C), isoliert und nach der Methode von Maxam & Gilbert (1977) sequenziert (s. 2.13.).

Abbildung 16 E, F und G zeigt Autoradiogramme von Sequenzgelen und gibt den Anfang der Sequenz des 320 bp-Terminus des mit BglII geschnittenen EcoRI-41-Subfragments des 1,9 kb-HindIII-Fragments aus pEN88-DNA (Abb. 16, H). Die aufgeführte Sequenz ergibt sich aus den drei abgebildeten Sequenzgelen. Das Gel "E" zeigt die Nukleotidsequenz zwischen Position 6 und 20, Gel "F" zwischen 10 und 40 und Gel "G" zwischen Position 20 und 68. Die ersten 6 Nukleotide lassen sich aus der EcoRI-Schnittsequenz ableiten.

Diese Sequenz zeigt Homologie zu bekannten prokaryotischen Promotoren (s.u., vgl. Abb. 19, Kapitel 4.3.). Die bisher untersuchten Sequenzen der übrigen EcoRI-Subfragmente dagegen ergaben keine Anhaltspunkte für Promotorstrukturen. Es wurden von jedem EcoRI-Ende her etwa 100 Nukleotide sequenziert. Die internen Sequenzen der EcoRI-42-Einzelstränge (s.o.) können daher die von Wilson & Murray (1979) postulierte Promotorstruktur dieses Fragments enthalten (vgl. 4.2.).

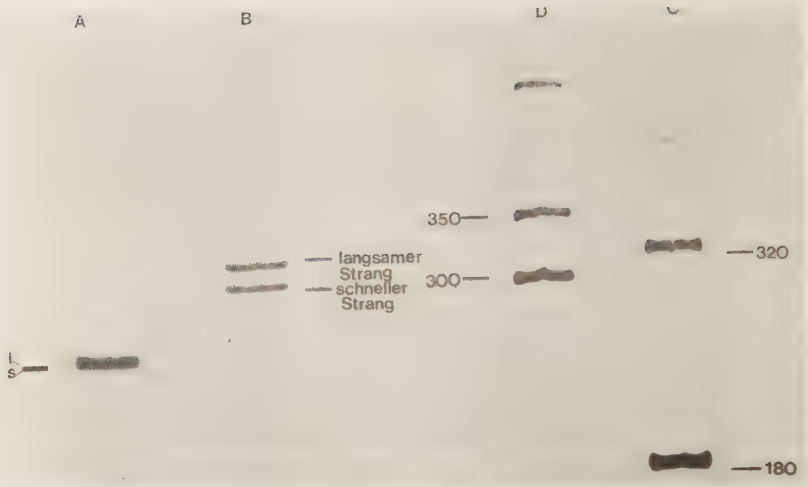


Abbildung 16: DNA-Sequenzierung
Die Abbildung zeigt Autoradiogramme von DNA-Strangtrennungsgelen des linken 300 bp-Terminus (A) und des Fragments EcoRI-42 (B), die Trennung der BglII-Subfragmente des Fragments EcoRI-41 (C) und der ClaI-Subfragmente des rechten 650 bp-Terminus (D) sowie von 20%- (E, F) und 10%- (G) Sequenzgelen. Der Probenauftrag auf die Sequenzgele war jeweils von links nach rechts: G, A+G, T+C, C. Zahlen geben den Abstand des bezeichneten Nukleotids zum EcoRI-Schnitt bei 125,25 kb in bp an. Schwache T's in der T+C-Spur waren bei längerer Expositionszeit deutlich zu erkennen, sie sind vermutlich die Folge restlichen Salzes aus den Äthanolfällungen. Verunreinigungen der C-Spur könnten durch unzureichende Piperidinspaltung, Oxydation des Hydrazins und/oder restliches Salz in den DNA-Proben erklärt werden (vgl. auch Maxam & Gilbert, 1980).

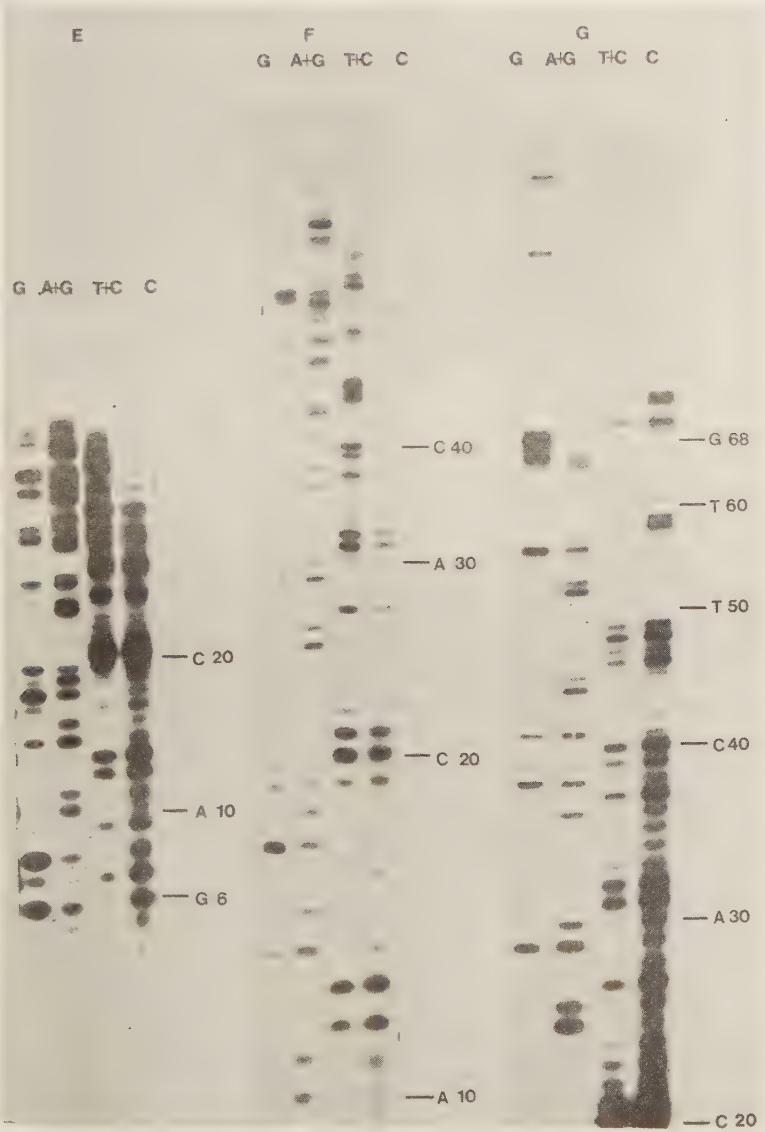


Abbildung 16:

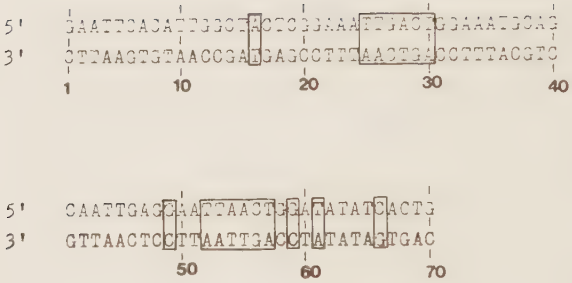


Abbildung 16: H

Die in Abbildung 16 H eingerahmten Homologie-Regionen zu bekannten prokaryotischen Promotoren unterstützen die Annahme, daß die Transkriptionsinitiation der T4-Ligase-Genregion in vitro am - bezogen auf Abbildung 17 - linken Ende des Fragments EcoRI-41 stattfindet; sie ermöglichen darüber hinaus eine Kartierung dieses frühen T4-Promotors bei 125,2 kb. Eine eingehende Diskussion der Sequenzhomologie erfolgt im Kapitel 4.3.

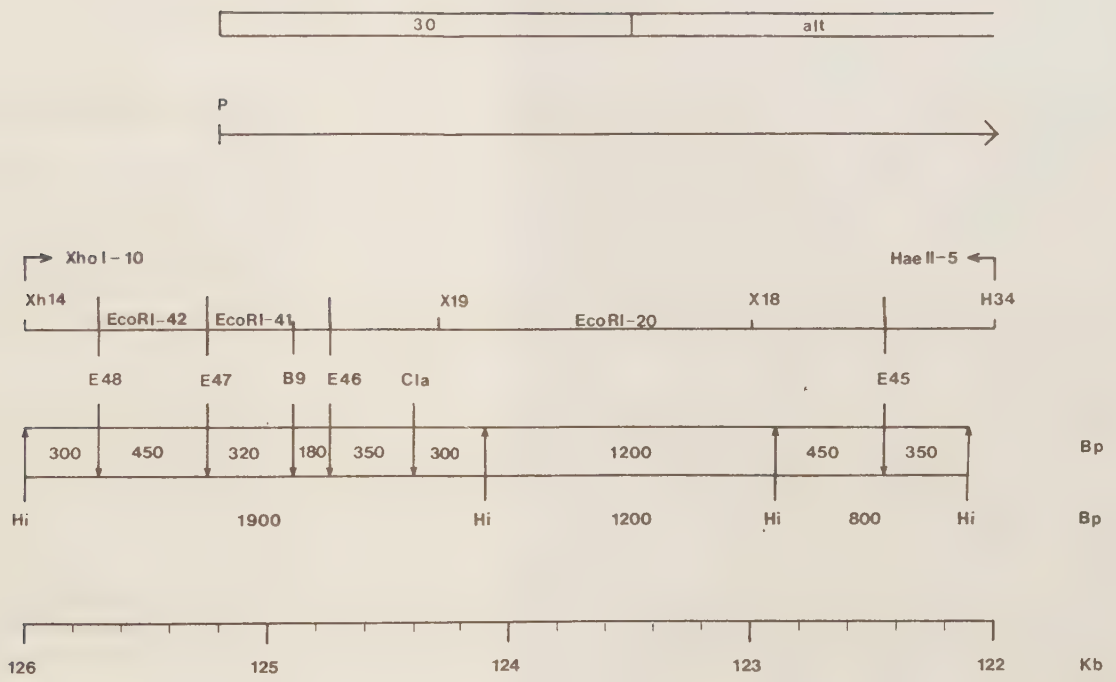


Abbildung 17: Schematische Darstellung der T4-Ligase-Genregion.
Die untere Skala gibt in kb den Abstand der Restriktionsschnitte zum genetischen Nullpunkt an. Pfeile weisen auf Restriktionsschnitte in pEN88-DNA hin. Zahlen zwischen den Pfeilen geben die Länge der HindIII-Fragmente bzw. -Subfragmente in bp an. Im oberen Bereich der Restriktionskarte sind Schnitte in T4 dC-DNA angegeben (vgl. Tab. 10, Anhang). Die Abkürzungen der Restriktionsenzyme sind in den Tabellen 7 und 10 erläutert. Der waagerechte Pfeil symbolisiert die Ligase-alt-Gen-Transkriptionseinheit. Zur Lage der Genorte vgl. Tabelle 11 (Anhang).

4. DISKUSSION

4.1. Physikalische Kartierung der DNA des Phagen T4

Seit der Entwicklung von T4 dC-Mutanten (Snyder et al., 1976, Mattson et al., 1977) wurden in mehreren Arbeitsgruppen physikalische Kartierungen der T4 dC-DNA durchgeführt. Restriktionskarten, die mit der genetischen Karte des Phagen T4 korreliert sind, liegen zur Zeit für die Enzyme BamHI, SmaI, KpnI, SalI, BglII, XhoI, XbaI, HaeII, EcoRI, BglI, PstI, HindIII und PvuI vor (Carlson, 1980, O'Farrell et al., 1980, Marsh & Hepburn, 1981, Yee & Marsh, 1981, Niggemann et al., 1981). Darüber hinaus wurden für einige Genomabschnitte - meist auf Grund von Klonierungsergebnissen - Restriktionskarten aufgestellt (Wilson et al., 1977, Mileham et al., 1980, Hänggi & Zachau, 1980, Fukada et al., 1980, Revel, 1981, Pribnow et al., 1981, Krisch & Selzer, 1981).

Abbildung 20 zeigt diese Restriktionskarten im Vergleich (s. Anhang). Wegen der zyklischen Permutation ergeben sich bei der physikalischen wie bei der genetischen Kartierung der T4-DNA zirkuläre Karten. BamHI schneidet T4-DNA einmal. Dieser Schnittpunkt bei 85,4 kb wurde daher als physikalischer Nullpunkt gewählt und in der Tabelle 10 und der Abbildung 20 (s. Anhang) zur Linearisierung der DNA benutzt.

Abgesehen von leicht abweichenden Molekulargewichtsangaben für einzelne Restriktionsfragmente, die jedoch im Rahmen experimentell bedingter Schwankungen liegen, zeigen die physikalischen Karten der verschiedenen Arbeitsgruppen und die Korrelation dieser Karten mit der genetischen Karte des Phagen T4 ein hohes Maß an Übereinstimmung. Unterschiede zwischen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgestellten EcoRI-Karte (s. 3.1.) und der von

O'Farrell et al. (1980) publizierten Karte sind in Tabelle 8 zusammengefaßt:

Tabelle 8: Unterschiede in der Kartierung von EcoRI-Schnitten der T4 dC-DNA

unter-suchtes Fragment	A[1] EcoRI-Fragment (kb)	A[1] Schnitt-position (kb)	B[2] EcoRI-Fragment (kb)	B[2] Schnitt-position (kb)
SalI-3	0,6	42,2	-	-
	0,65	55,1	1,1	55,1
	0,3	55,4		
SalI-4	0,6	70,05	-	-
BglII-5	0,4	107,3	-	-
	0,4	111,2	-	-
SalI-6	3,8	146,5	4,25	147,5
	1,1	147,6	3,25	150,75
	2,8	150,4		

1) EcoRI-Karte nach O'Farrell et al., 1980
2) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte EcoRI-Karte, s. auch Niggemann et al., 1981.

Da mit unterschiedlicher Methodik gearbeitet wurde und das EcoRI-Restriktionsmuster bei O'Farrell et al. nicht mit den tabellarisch aufgeführten EcoRI-Fragmenten korreliert wurde, können Erklärungen für diese Diskrepanzen nur vermutet werden: Gegenüber O'Farrell et al. fehlen in der EcoRI-Karte der vorliegenden Arbeit vier Fragmente von 0,4 kb bzw. 0,6 kb (s. Tab. 8). Zwar ist es grundsätzlich denkbar, daß Fragmente mit Molekulargewichten um 0,5 kb bei der im Kapitel 3.1. beschriebenen Methode übersehen werden, da relativ große Fragmentmengen benötigt werden, um Subfragmente von 0,5 kb oder kleiner durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar zu machen.

O'Farrell et al. arbeiteten dagegen mit radioaktiv markierten Partial-Restriktionsfragmenten, die unabhängig vom Molekulargewicht nachgewiesen werden können.

Die den fehlenden EcoRI-Fragmenten entsprechenden Bereiche der physikalischen Karte wurden jedoch gezielt auf kleine Fragmente hin untersucht:

Nach O'Farrell et al. (vgl. Tab. 8 A) enthält das Fragment BglII-5 zwei EcoRI-Subfragmente mit 0,4 kb, die bei 107,3 kb und 111,2 kb kartiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein analytisches Agarosegel mit den BglII-5-EcoRI-Subfragmenten überladen. Dennoch wurden andere als die bereits kartierten EcoRI-Fragmente nicht beobachtet.

Abbildung 5 zeigt, daß im Fall der EcoRI-Restriktion der Fragmente XhoI-7 bzw. SalI-4 das EcoRI-40-Fragment deutlich zu sehen ist, während das von O'Farrell et al. mit 0,4 kb beschriebene Fragment bei 70,05 kb, d.h. dem EcoRI-40 benachbarte Fragment nicht gefunden wurde. Das 0,6 kb-SalI-4-Subfragment entspricht EcoRI-39, das, wie die Abbildung 5 zeigt, nicht aus XhoI-7 entsteht und daher nicht dem von O'Farrell beschriebenen Fragment entsprechen kann.

Das Fragment SalI-3 sollte nach O'Farrell et al. das 0,6 kb-Fragment bei 42,2 kb enthalten (vgl. Tab. 8 A). Innerhalb der SalI-3-Region wurden zwar Fragmente mit 0,6 kb kartiert (s. Abb. 21 am Ende dieser Arbeit), jedoch nicht neben EcoRI-36, d.h. nicht im Bereich der Position 42,2 kb. Statt der beiden Fragmente mit 0,65 kb und 0,3 kb konnte das 1,1 kb-Fragment (s. Tab. 8 B) bestätigt werden.

Im Fall des Fragments SalI-6 wurden durch die Feinkartierung dieses Bereichs (s. 3.4.1.) wiederholt die EcoRI-Schnitte bei 143,25 kb, 147,5 kb und 150,75 kb bestätigt, so daß die in dieser Arbeit beschriebenen EcoRI-Subfragmente des Fragments SalI-6 als gesichert angesehen werden können. Das 1,1 kb-Fragment (s. Tab. 8 A) wurde nicht beobachtet.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die beobachteten Unterschiede zwischen physikalischen Karten auf Sequenzunterschiede in der DNA zurückzuführen sind und auf der Verwendung unterschiedlicher Mutantenstämme zur Konstruktion dieser Karten beruhen.

Die Zuordnung der physikalischen Karte zur genetischen Karte des Phagen T4 wurde durch vergleichende Restriktionsanalyse der DNA der T4-Mutanten T4 "rIIH23", T4 saΔ9 und T4 alc536 vorgenommen. Darüber hinaus erlauben die publizierten Daten über die Klonierung von T4 EcoRI-Fragmenten und die Charakterisierung dieser Klone hinsichtlich der von ihnen repräsentierten Genorte eine Zuordnung dieser Gene zu den entsprechenden, in der vorliegenden Arbeit kartierten EcoRI-Fragmenten. Tabelle 9 enthält eine Zusammenfassung der Korrelation zwischen EcoRI-Fragmenten und Genorten des Phagen T4. Die Tabelle enthält außerdem die Positionen ("map position") der angegebenen Gene nach Wood & Revel (1976). Ein Vergleich zwischen diesen theoretisch zu erwartenden und den auf Grund der Korrelation von genetischer und physikalischer Karte tatsächlich gefundenen Positionen zeigt, daß sich die Verzerrungen zwischen physikalischem und genetischem Maßstab in einem Bereich von weniger als 5 kb bewegen.

Zur Lokalisierung weiterer Genorte auf der physikalischen Karte wurden Genabmessungen und -abstände aus genetischen Karten des Phagen T4 (Wood & Revel, 1976, Mosig, 1980) und bekannte Molekulargewichte der entsprechenden Genprodukte herangezogen. Die Angaben der Abbildung 20 und der Tabelle 11 (s. Anhang) sind als Näherungswerte zu verstehen. Verzerrungen zwischen genetischem und physikalischem Maßstab (s.o.) und die vor allem bei Fragmenten mit großem Molekulargewicht auftretenden Mängel in der elektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmung machen es weiterhin erforderlich, diese Daten vor einer detaillierten Analyse bestimmter DNA-Abschnitte zu überprüfen. Als Orientierungshilfe und als Basis zur Feinkartierung bei der Untersuchung definierter Genomabschnitte des Phagen T4 sind diese Karten jedoch geeignet.

Tabelle 9: Zuordnung von EcoRI-Fragmenten zu Genorten des Bakteriophagen T4.

EcoRI-Fragment	MW (kb)	Genort(e)	Position (Wood & Revel)	Position (s. Tab. 10)	Referenz
7	4,8	50 bis 5	78 - 81	76,0 - 80,8	Wilson et al.,
25	1,9	6, 7	82 - 85	80,8 - 82,7	1977
11	3,8	7, 8	85 - 87	82,7 - 86,5	
16	3,1	9, 10, 11	88 - 92	86,5 - 89,6	
41	0,5	12	93	89,6 - 90,1	
5	5,6	13 bis 16	95 - 98	90,1 - 95,7	
36	0,9	- 17	98	95,7 - 96,6	
29	1,5	(18, 19, 20)	100 - 102	96,6 - 98,1	
39	0,6	(18, 19, 20)	100 - 102	98,1 - 98,7	
13	3,3	(18, 19, 20)	100 - 102	98,7 -102,0	
3	6,1	25 bis 29 (48, 54)	112 - 120	111,55-117,65	
23	2,05	35, 36	152 - 153	152,85-154,9	
26	1,8	42	23	24,1 - 25,9	
30	1,45	43	23	27,15- 28,6	
4	5,7	62 bis 46	31 - 36	28,6 - 34,3	
5	5,6	tRNA	70 - 72	70,4 - 76,0	Fukada et al.,
40	0,55	tRNA	70 - 72	69,85- 70,4	1980 a
9b	4,15	60 bis 52	161 - 3	161,85- 2,5	Selzer et al.,
9a	4,25	32	145	143,25-147,5	1978
19	2,7	39	4	2,85- 5,55	Mattson et al.,
17	3,0	40, 41	20 - 22	21,1 - 24,1	1977

Fortsetzung Tabelle 9:

EcoRI-Fragment	MW (kb)	Genort(e)	Position (Wood & Revel)	Position (s. Tab. 10)	Referenz
20	2,3	30	122	122,45-124,75	Mileham et al.,
41	0,5	30	122	124,75-125,25	1980
42	0,45	30	122	125,25-125,7	
29	1,5			125,7 -127,2	
15	3,15	31	127	127,2 -130,35	
33	1,15			130,35-131,5	
46	0,15			131,5 -131,65	
21	2,2	pseT	(130)	131,65-133,85	
31	1,3	63	133	133,85-135,15	
27	1,7	63	133	135,15-136,85	
17	3,0	nrdB	138	136,85-139,85	
38	0,7	nrdA	140	139,85-140,55	
19	2,7	nrdA, td	140 - 141	140,55-143,25	
9	4,25	frd, 32	142 - 145	143,25-147,5	
14	3,25	34	149	147,5 -150,75	Revel, 1981
34	1,1	34	149	150,75-151,85	
45	0,2	34	149	151,85-152,05	
37	0,8	34, 35	149 - 152	152,05-152,85	
23	2,05	35, 36, 37	152 - 155	152,85-154,9	
16	3,1	37, 38	155 - 157	154,9 -158,0	
(37)	0,8			158,0 -(158,8)	

4.2. Transkription

Die Hybridisationsergebnisse der Kapitel 3.3.2. und 3.4.1. ergaben eine Bestätigung der Organisation später Gene in zwei Gruppen: Der Zuordnung von Genorten zu EcoRI-Fragmenten (vgl. 4.1.) entsprechend liegen späte Gene zwischen 74 kb (Gen 3) und 121 kb (Gen 54) sowie zwischen 148,6 kb (Gen 34) und 159 kb (Gen t); in vitro synthetisierte RNA hybridisiert nicht mit DNA-Fragmenten, die zwischen 73,2 kb und 122,45 kb sowie zwischen 148,7 kb und 158 kb liegen (s. Tab. 4 und 6).

Die dazwischen liegenden Gruppen früher Gene werden unterschiedlich stark in vitro und zu frühen Zeiten in vivo transkribiert. Fragmente, die nach Behandlung der gesamten T4 dC-DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen, erwiesen sich jedoch als ungeeignet, um die Hybridisationsraten von in vivo-RNA der unterschiedlichen Zeiten nach Infektionsbeginn genauer zu untersuchen. Diese Fragmente sind entweder zu groß (s. 3.3.1.), oder sie bilden Mehrfachbanden nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen (s. z.B. das EcoRI-Restriktionsmuster der Abb. 4), so daß auch Hybridisationen der - relativ zu den BglII-Fragmenten - kleinen EcoRI-Fragmente mit in vivo-RNA keine eindeutigen Ergebnisse ergaben.

Die weitere Untersuchung der frühen Transkription des Phagen T4 machte daher von Restriktionsfragmenten Gebrauch, die überwiegend als Einzelbanden in Agarosegelen eindeutig identifizierbar und kleiner als 3 kb waren (s. 3.3.2.). Mit Hilfe dieser Fragmente wurden Bereiche der T4 dC-DNA lokalisiert, die in vitro besonders effizient transkribiert werden: 73,2 kb bis 70,4 kb, 59,8 kb bis 47,2 kb, 21,1 kb bis etwa 158 kb, 148,7 kb bis 140,55 kb und 133,85 kb bis 122,45 kb.

Eine Addition dieser Teilbereiche zeigt, daß etwa 61,5 kb der saΔ9-DNA stark mit in vitro-RNA hybridisieren. Da der größte Teil der 2,5 kb langen Region, die der saΔ9-DNA fehlt (s. 3.2.), in vitro transkribiert wird

(Goldfarb & Burger, 1981), kann von einem DNA-Bereich von insgesamt etwa 64 kb ausgegangen werden, der unter den genannten Bedingungen (s. 2.9.) in vitro stark transkribiert wird. Da die Addition der Kettenlängen der hauptsächlichen in vitro-Transkriptionsprodukte eine Gesamtlänge von 63 000 Nukleotiden ergibt (Rüger, 1978), dürfte es sich bei dem Näherungswert von 64 kb um eine durchaus realistische Einschätzung des Bereichs der T4-DNA handeln, der in vitro transkribiert wird.

Die starken in vitro-Promotoren, die in den oben genannten Bereichen liegen, sind vermutlich frühe Promotoren des Phagen T4 (vgl. 1.3. und 1.4.). Um eine an einem solchen frühen Promotor initiierte Transkriptionseinheit zu untersuchen, wurde das UpC-Transkript der T4 Wildtyp-DNA kartiert (s. 3.4.2.).

Die Transkriptionsversuche, die zur Kartierung zweier Promotoren des Phagen T4 führten, wurden an T4 dC-DNA durchgeführt. Da die DNA der T4 Wildtypphagen glucosyliertes Hydroxymethylcytosin enthält, stellt sich die Frage, inwieweit die Transkription der T4-DNA an Desoxycytosin-enthaltender DNA untersucht werden kann. Einige Aspekte dieses Problems sollen im folgenden diskutiert werden.

Die Transkription der T4 dC-DNA in vivo ist abhängig von der Funktion des T4 *alc*-Genprodukts: In Anwesenheit eines funktionellen *alc*-Genprodukts wird nur an vollständig modifizierter T4-DNA transkribiert (Kutter et al., 1981). In Abwesenheit eines funktionellen *alc*-Genprodukts wird jedoch an T4 dC-DNA transkribiert. Nach Infektion entsprechender *E.coli*-Stämme durch T4 *alc*$^-$-Phagen werden nach Transkription an der infizierenden T4 dC-DNA frühe, mittlere und späte Genprodukte synthetisiert, und es kommt zur Bildung infektionsfähiger Phagennachkommen (Snyder et al., 1976).

Die frühen Gene des Phagen T4 werden von der nicht durch T4-spezifische Proteine modifizierten RNA-Polymerase aus *E.coli* abgelesen (s. 1.2.), die Desoxycytosin-ent-

haltende DNA als natürliche Matrize hat.

Die Transkription in einem hochgereinigten in vitro-System, wie es für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen verwendet wurde, betrifft vermutlich nur die frühen Gene, die in vivo nach Transkriptionsinitiation an frühen Promotoren abgelesen werden (s. 1.3. und 1.4.) und nicht unter dem Einfluß von T4-spezifischen Regulationsfaktoren stehen.

Im Autoradiogramm elektrophoretisch getrennter in vitro-Transkriptionsprodukte der T4 dC-DNA wurden keine eindeutigen Unterschiede zu denen der T4 Wildtyp-DNA gefunden.

Die oben genannten Argumente gaben Anlaß zu der Annahme, daß zumindest frühe Transkriptionseinheiten des Phagen T4 in vitro an dC-DNA mit der nicht modifizierten RNA-Polymerase aus E.coli in Abwesenheit des alc-Genprodukts untersucht werden können. Es wurde daher versucht, frühe Transkriptionseinheiten durch in vitro-Transkription an isolierten Restriktionsfragmenten der T4 dC-DNA zu kartieren.

Die Kartierung des UpC-Transkripts machte von der Methode der Dinukleotid-Elongation (Downey & So, 1970) Gebrauch, die es ermöglichte, die Transkription selektiv nur an dem UpC-Promotor zu initiieren. Durch Transkriptionsversuche an Restriktionsfragmenten unter Standardbedingungen (s. Abb. 13) wurde sichergestellt, daß ohne Dinukleotid-Elongation in der DNA-Region, die dem UpC-Transkript homolog ist, die Transkription ebenfalls nur an einem Promotor bei 148,5 kb initiiert und bei 144,6 kb terminiert wird.

Der UpC-Promotor müßte der genetischen Karte entsprechend (vgl. Abb. 2) bereits im Bereich des späten Gens 34 liegen. Überlappende Gene sind zwar für kleine virale Genome wie das des Phagen ϕX174 und des Virus SV40 nachgewiesen worden (Barrell et al., 1976, Shaw et al., 1978, Sanger et al., 1977b, Fiers et al., 1978), im Fall des Phagen T4 gibt es aber keinen Hinweis auf eine

solche Genomstruktur, die auch in Hinblick auf die Größe des Genoms von 166 kb wenig wahrscheinlich ist. Revel (1981) hat den Bereich der Gene 34 bis 38 in λ-Vektoren kloniert. Die C-terminale Region des Gens 34 wurde mit zwei EcoRI-Fragmenten mit 0,2 kb und 0,8 kb (EcoRI-45 und -37, vgl. Abb. 21 am Ende dieser Arbeit) korreliert. Die physikalische Kartierung des N-terminalen Bereichs des Gens ergab jedoch Hinweise dafür, daß der DNA-Bereich, der für das Genprodukt 34 kodiert, kürzer ist, als bei Wood & Revel (1976) angegeben wird. Für das EcoRI-14-Fragment bedeutet das, daß der Beginn des Gens 34 nicht von dem HindIII-Schnitt bei 148,25 kb (s. Abb. 14, vgl. Revel, 1981) begrenzt wird, sondern bis maximal 148,6 kb in das Fragment EcoRI-14 hineinragt. Das heißt aber auch, daß der UpC-Promotor nicht innerhalb des Gens 34, sondern im frühen Genbereich liegt.

Hercules & Wiberg (1971) beschrieben eine Klasse von T4-Mutanten, das (oder auch suα), die Mutationen in den Genen 46 und 47 supprimieren. Die das-Mutationen wurden kartiert; sie sind entweder eine spezielle Mutationsklasse des Gens 33 oder ein neues T4-Gen zwischen Gen 33 und Gen 34.

Zwischen dem UpC-Promotor bei 148,5 kb und dem Beginn des Gens 33 bei etwa 147,4 kb (vgl. Krisch & Selzer, 1981) liegt ein Bereich von 1100 bp, der Kodierungskapazität für ein Protein von etwa 40 000 D hat. Drei der SalI-6-spezifischen in vitro-Translationsprodukte können ihren Molekulargewichten von etwa 36 000 D, 14 000 D und 17 000 D den Genprodukten 32, 33 und dem noch von SalI-6 kodierten Teil des frd-Gens zugeordnet werden (vgl. Tab. 11, Anhang). Das Molekulargewicht des Genprodukts 59 ist nicht bekannt, der dem Gen 59 entsprechende DNA-Bereich hat aber eine Kodierungskapazität für ein Protein von maximal 40 000 D. Die beiden in vitro synthetisierten Proteine mit Molekulargewichten von etwa 40 000 D und 25 000 D könnten den Produkten der Gene das und 59 entsprechen (vgl. Abb. 13).

Die Transkriptionsuntersuchungen an SalI-6-ClaI-Subfragmenten und an EcoRI-9a erlaubten die Kartierung eines zweiten starken in vitro-Promotors, des Promotors des frd-Gens, bei 144,59 kb (s. 3.4.2.). Der Terminator dieses frd-Transkripts liegt entweder bei 142,69 kb oder bei 141,59 kb: Die Restriktionsfragmente SalI-6 und SmaI-2 überlappen sich so, daß SmaI-2 neben weiteren Genen auch alle frühen, in SalI-6 liegenden Gene trägt; alle an SalI-6 initiierten Transkripte werden daher auch an SmaI-2 initiiert. SmaI-2 wurde zwischen 148,7 kb und 133,1 kb kartiert (s. Tab. 10, Anhang), geht etwa um 10 kb über das frd-Gen hinaus (s. Tab. 11, Anhang) und ist somit als Matrize für das vollständige frd-Transkript geeignet.

Das längste SmaI-2-Transkript ist das UpC-Transkript, wie der Dinukleotid-Elongationsansatz zeigt (s. Abb. 13). Da bereits das vorzeitig terminierte "run off"-Transkript des SalI-ClaI-2-Subfragments 1000 Nukleotide lang ist, kann das ebenfalls mit 1000 Nukleotiden bestimmte kürzeste SmaI-2-Transkript nicht das vollständige frd-Transkript sein. Die etwa 2500 Nukleotide lange SmaI-2-spezifische RNA bildet im Autoradiogramm eine schwache Bande, die daher nicht der starken Bande entsprechen kann, die das SalI-6-spezifische Transkript bildet. Die übrigen beiden SmaI-2-Transkripte mit 1900 und 3000 Nukleotiden Länge könnten dagegen die Information des frd-Gens tragen.

Im Fall der 1900 Nukleotide langen RNA würde der Terminator bei 142,69 kb liegen, es würde nur das frd- Gen abgelesen; Hänggi & Zachau (1980) postulieren eine maximal 1840 Nukleotide lange frd-RNA.

Im Fall des 3000 Nukleotide langen SmaI-2-Transkripts würde der Terminator bei 141,59 kb liegen,und es würde zusammen mit dem frd-Gen auch das td-Gen abgelesen (vgl. Abb. 18 C).

Das EcoRI-19-Fragment, das zwischen 143,25 kb und 140,55 kb kartiert wurde, hybridisiert stark mit in vitro synthetisierter RNA (s. Tab. 4B). Abbildung 18 C zeigt, daß diese Hybridisation nicht auf die Transkription des

frd-Gens zurückgeführt werden kann. Die schwache Hybridisation der in vitro synthetisierten RNA mit den an EcoRI-19 anschließenden Fragmenten EcoRI-38 und -17 zeigt, daß das dem td-Gen benachbarte nrdA-Gen nur selten in vitro transkribiert wird. Aus diesen Beobachtungen läßt sich ableiten, daß das td-Gen in vitro stark transkribiert wird.

Das td-Gen könnte daher durch Elongation des frd-Transkripts abgelesen werden, in diesem Fall würde die Transkriptionseinheit bei 144,59 kb initiiert und bei 141,59 kb terminiert. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß das td-Gen einen eigenen starken Promotor besitzt, so daß die Termination des frd-(td)-Transkripts auf Grund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden konnte.

400 Nukleotide vor dem SalI-Schnitt bei 143,59 kb, d.h. bei 143,99 kb, wurde auf Grund vorläufiger Ergebnisse ein zweiter schwacher frd-Promotor vermutet (s. 3.4.2.): Da späte Gene - das Gen 34 am entgegengesetzten Ende des Fragments SalI-6 - nicht in vitro transkribiert werden (s.o.) und das 400 Nukleotide lange SalI-6-spezifische Transkript (s. Abb. 13) nicht zum Standardtranskriptionsmuster der T4-DNA gehört, ist diese RNA vermutlich ein weiteres, vorzeitig terminiertes "run off"-Transkript des frd-Gens. Dieses SalI-6-spezifische "run off"-Transkript könnte - der schwachen Bande im Autoradiogramm entsprechend - dem Beginn des 2500 Nukleotide langen SmaI-2-Transkript homolog sein.

Die in vitro-Transkription des T4 Ligase-Gens wird im EcoRI-41-Fragment, vermutlich bei 125,2 kb, initiiert (vgl. 3.5.). Wilson & Murray (1979) haben auf Grund genetischer Analysen vermutet, daß der Promotor des Ligase-Gens im EcoRI-42-Fragment liegt. Eine Möglichkeit zur Erklärung dieser unterschiedlichen Kartierung des Ligase-Gen-Promotors bietet die Hypothese, daß es auch im Fall des T4-Ligase-Gens zwei hintereinanderliegende Promotoren

gibt, wie es bereits für die tRNA- und die D-Region des Phagen T4 beschrieben wurde:

Die tRNA-Region wird von zwei Promotoren aus in vitro transkribiert. Der zweite Promotor (P_2 in Abb. 18 A) ist stärker als der erste (P_1) und wird auch in vivo benutzt. Die in vitro-Transkripte mit 3000 und 3500 Basen werden am gleichen Terminator (T) beendet (Fukada et al., 1980, Goldfarb & Daniel, 1981, Goldfarb, 1981; vgl. Abb. 18 A).

Die Transkription der D2-Region und der Gene 52, rV und mot in vitro, vermutlich aber auch in vivo, wird an zwei Promotoren in der Nähe des denB-Gens initiiert. Die Termination dieser Transkripte kann in vitro sowohl nach dem Gen 52 als auch nach dem Gen mot erfolgen (Daegelen & Brody, 1976, Goldfarb & Burger, 1981; vgl. Abb. 18 B).

Falls auch im Fall des Ligase-Gens zwei Promotoren in einem Abstand von 200 bis 500 Nukleotiden zueinander vorhanden sind, wie es für die oben beschriebenen Transkriptionseinheiten nachgewiesen wurde, so könnte das erklären, warum eine in vivo-Analyse mit genetischen Methoden auf einen Promotor im EcoRI-42-Fragment schließen ließ, in vitro dagegen ein Promotor im Fragment EcoRI-41 lokalisiert wurde.

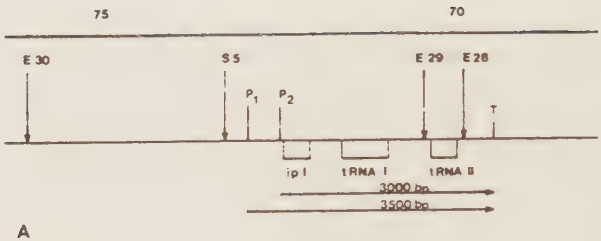
Die Kettenlänge des HaeII-5-spezifischen Transkripts von etwa 3000 Nukleotiden (s. 3.5.) und die Lage des entsprechenden Promotors bei 125,2 kb läßt darauf schließen, daß diese in vitro-RNA vermutlich die Information für die T4 DNA-Ligase und für einen Teil des alt-Genprodukts trägt (vgl. Abb. 18 D).

Neben den bereits zitierten Untersuchungen zur Transkription der tRNA- und der D2-Region wurde in vivo eine "immediate early" Transkriptionseinheit kartiert, die vor dem Gen 39 initiiert wird und vermutlich nach dem rIIA-Gen, in Gegenwart von Chloramphenicol (vgl. 1.3.) jedoch schon vor dem rIIA-Gen, terminiert wird (Daegelen & Brody, 1976, vgl. Abb. 18 B).

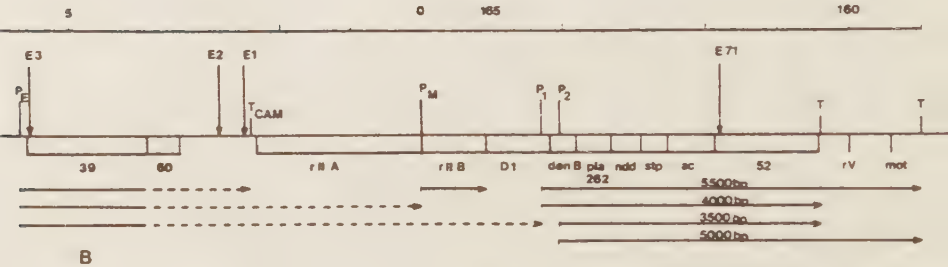
Die in diesem Kapitel diskutierten Transkriptionsergebnisse der vorliegenden Arbeit befinden sich, ebenso wie die in Abb. 18 A und B dargestellten Ergebnisse anderer Autoren, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Hybridisation von in vitro-Transkriptionsprodukten der T4 Wildtyp-DNA mit Restriktionsfragmenten, die zwischen 148,7 kb und 140,55 kb (1), 125,25 kb und 122,45 kb (2), 73,2 kb und 70,4 kb (3) und zwischen 5,55 kb und 158 kb (4) kartiert wurden (vgl. Tab. 4B). Diesen Restriktionsfragmenten entsprechen die Gene das, 33, 59, 32, frd, td (1), 30, alt (2), tRNA (3) und die Gene 39, 60, rIIA, rIIB, D1, denB, pla262, ndd, stp, ac, 52, rV, mot (4). Abbildung 18 gibt eine Zusammenfassung dieser bisher kartierten Transkriptionseinheiten.

Die übrigen DNA-Bereiche, die ebenfalls stark mit in vitro synthetisierter RNA hybridisieren, bieten sich als Ausgangspunkt für ähnliche Transkriptionsuntersuchungen an, wie sie in dieser Arbeit am Beispiel des UpC-Transkripts durchgeführt wurden.

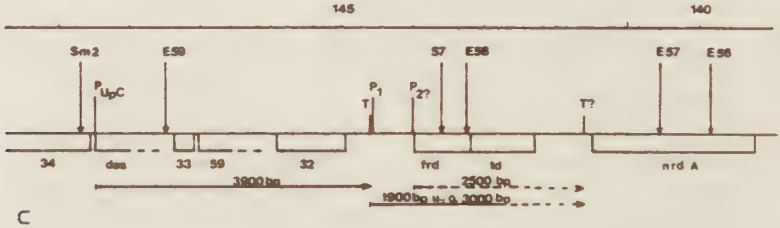
Analoge Hybridisations- und Transkriptionsuntersuchungen der in vitro-RNA, die in Systemen mit mittlerer oder später Spezifität (vgl. 1.4.) synthetisiert wird, könnte darüber hinaus die Lokalisierung mittlerer und später Promotoren erlauben. Die Verwendung regulatorisch defekter Mutanten des Wirts (ρ-Faktor-Mutanten) und des Bakteriophagen (z.B. mot-Mutanten) bei der Präparation der entsprechenden Lysate für diese in vitro-Systeme sollte einen Einblick in die Transkriptionsregulation des Phagen ermöglichen.



A



B



C

D

Abbildung 18: Frühe Transkriptionseinheiten des Bakteriophagen T4 nach: Fukada et al., 1980, Goldfarb & Daniel, 1981, Goldfarb, 1981 (A); Daegelen & Brody, 1976, Goldfarb & Burger, 1981 (B); diese Arbeit (C), Wilson & Murray, 1979, Gram, 1982, diese Arbeit (D).

4.3. Klonierung und Sequenzierung

Versuche, den UpC-Promotor zu klonieren, blieben erfolglos. Schwierigkeiten bei der stabilen Etablierung von Hybridplasmiden oder -phagen, die frühe Gene virulenter Bakteriophagen integriert tragen, wurden bereits häufig beschrieben. So konnte z.B. das EcoRI-9a-Fragment, das unter anderem das Gen 32 trägt, nur mit einer Gen 32-amber-Mutation kloniert werden (Krisch & Selzer, 1981), die das offenbar für den Klon lethale Genprodukt - das DNA-Bindeprotein des Phagen - ausschaltet. Die direkte Klonierung von T4-DNA aus Phagenstämmen, die das zu klonierende Gen bereits in mutierter Form tragen, wird dadurch erschwert, daß die modifizierte DNA dieser Mutantenstämme nicht von Restriktionsendonukleasen hydrolysiert wird. Jede Mutation muß daher zur Klonierung erst in T4 dC-DNA eingekreuzt werden.

Frühe Promotoren von Bakteriophagen können außerdem als DNA-Sequenzen mit hoher RNA-Polymerase-Affinität das komplexe Zusammenspiel der Vektor- und Wirts-Genregulationsmechanismen stören. Eine Diskussion dieses Problems am Beispiel des Promotors der T4 tRNA-Region findet sich bei Fukada et al. (1980).

In Ermangelung eines UpC-Klons wurde mehrfach versucht, den Promotor direkt, d.h. als T4 dC-DNA zu sequenzieren. Diese Versuche ergaben jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Zum einen behindern Reste von Hydroxymethylcytosin in der DNA die Sequenzierung (vgl. Maxam & Gilbert, 1980). Zum andern stellt die Isolation ausreichender Mengen kleiner T4 DNA-Fragmente ein technisches Problem dar: Besonders geeignet zur Sequenzierung sind Restriktionsfragmente von etwa 200 bp Länge, z.B. die HinfI-Fragmente zwischen 148,25 kb und 148,7 kb (s. Tab. 5). Fragmente dieser Länge repräsentieren aber nur etwa 0,1% des T4-Genoms. Die vielen Aufarbeitungsschritte, die zur Isolation und Reinigung dieser Fragmente aus T4 dC-DNA erforderlich sind, bringen hohe DNA-Verluste und

schlechte Endmarkierungsraten mit sich. Gerade in Hinblick auf die DNA-Sequenzierung wird daher die Bedeutung der Klonierung als Methode zur Amplifikation kleiner DNA-Fragmente erkennbar.

Die Verwendung von Vektoren, die kürzlich zur Klonierung starker Promotoren virulenter Phagen entwickelt wurden (Gentz et al., 1981), sollte die effektivere Klonierung von T4-Promotorregionen ermöglichen.

Erst die Klonierung des T4-Ligase-Gens (s. 3.5.) erlaubte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Untersuchung eines frühen T4-Promotors durch DNA-Sequenzierung.

Prokaryotische Promotoren zeichnen sich durch strukturelle Gemeinsamkeiten wie die -35-Region und die Pribnow-Box aus (s. 1.1.). Es stellt sich daher die Frage, ob es in den Bereichen der T4-DNA, die von der nicht modifizierten RNA-Polymerase aus E.coli zur Transkriptionsinitiation benutzt werden, Sequenzen gibt, die den bereits bekannten Promotorsequenzen homolog sind. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die EcoRI-Subfragmente des 1,9 kb-HindIII-Fragments der pEN88-DNA jeweils vom 3'-Ende her nach der Methode von Maxam & Gilbert (1977) ansequenziert (s. 3.5.). Eines dieser EcoRI-Subfragmente entspricht dem EcoRI-Fragment 41, an dem in vitro die Transkriptionsinitiation der Ligase-Genregion des Phagen T4 erfolgt. Das - bezogen auf die Abbildungen in dieser Arbeit - linke Ende des EcoRI-41-Fragments zeigt Sequenzhomologie zu bekannten prokaryotischen Promotoren, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

Siebenlist et al. (1980) haben am Beispiel des E.coli lac UV5- und des T7 A3-Promotors untersucht, mit welchen Nukleotiden innerhalb der Promotorregion die RNA-Polymerase aus E.coli interagiert. Ein Vergleich mit 52 weiteren Promotorsequenzen bestätigte die Annahme, daß diese Kontaktbereiche ihre Entsprechung in anderen Promotoren haben.

Abbildung 19 zeigt Sequenzen von Promotoren, die von der RNA-Polymerase aus E.coli ohne akzessorische Proteine

erkannt werden; lac UV5 ist eine Promotormutation, die eine CAP-Protein-unabhängige Transkriptionsinitiation erlaubt. Zum Vergleich sind die in Kapitel 3.5. dargestellte Sequenz des Beginns des EcoRI-41-Fragments, die als Promotor des T4 Ligase-Gens in vitro dienen könnte und die erste publizierte Sequenz eines T4-Promotors, die des Promotors des Gens 57 (Herrmann, 1982) abgebildet.

Während der Bindung der RNA-Polymerase an die lac UV5-Promotorregion tritt das Enzym in Kontakt zur Pribnow-Box und zur -35-Region.

Die EcoRI-41-Sequenz weist eine fast vollständig konservierte -35-Region auf: T T G A C T (statt: T T G A C A). Zudem ist das terminale Adenosin das am häufigsten variierende Nukleotid der -35-Region (vgl. Siebenlist, 1980).

In der der Pribnow-Box entsprechenden Position wurde die Sequenz T T A A C T gefunden. Die Abweichung von der idealtypischen Sequenz T A T A A T ist zwar größer als im Fall der -35-Region; dieses Ausmaß an Variation ist aber, wie ein Vergleich mit den bei Siebenlist (1980) abgebildeten Promotorsequenzen zeigt, durchaus nicht ungewöhnlich.

Weitere Kontaktpunkte der RNA-Polymerase am lac UV5-Promotor sind das Guanin in Position -32 im nichtkodogenen Strang, die Guanine in Position -13 und -6 sowie das Adenin in Position -11 im kodogenen Strang.

Zwischen der -35-Region und dem möglichen Startpunkt der Transkription liegen im EcoRI-41-Fragment drei Nukleotide mehr als im T7 A3-Promotor. Variationen dieser Distanz von ±3 Nukleotiden wurden jedoch bei Promotoren wiederholt gefunden (vgl. Siebenlist, 1980). Unter Berücksichtigung dieser zusätzlichen drei Nukleotide stimmen die Positionen des Guanins in der -35-Position des nichtkodogenen Strangs, der Guanine in den Positionen -15 und -6 sowie des Adenins in Position -13 des kodogenen Strangs mit den oben genannten Standardpositionen der RNA-Polymerase-DNA-Kontaktpunkte überein.

In vielen Promotorsequenzen steht ein Adenin in

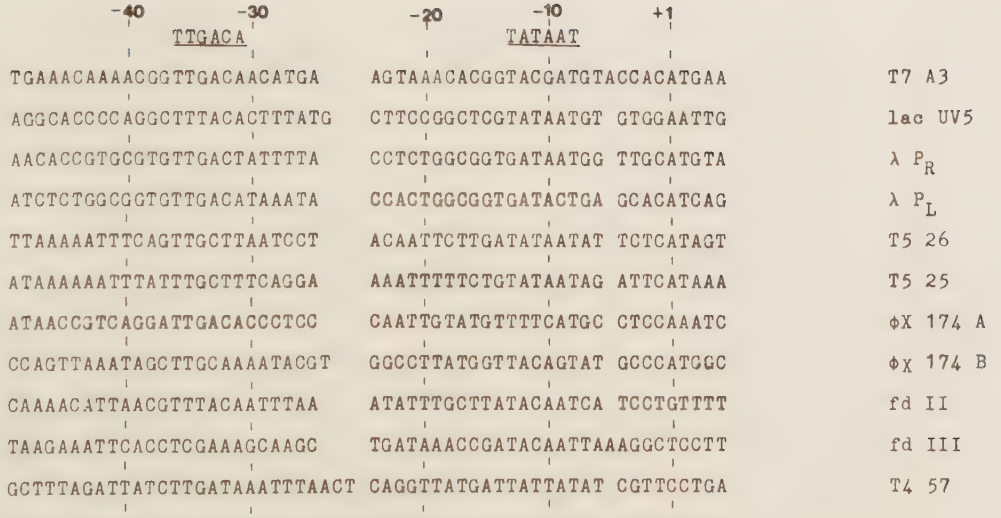


Abbildung 19: Ausgewählte Sequenzen prokaryotischer Promotoren (nach Siebenlist et al., 1980, Herrmann, 1982) im Vergleich mit einer möglichen Ligase-Gen (Gen 30) -Promotorsequenz des Bakteriophagen T4. Zur Erläuterung der Abbildung s. Text.

Position -45, das - unter Berücksichtigung der drei zusätzlichen Nukleotide - in entsprechender Position, nämlich bei -48, in der EcoRI-41-Sequenz gefunden wurde.

Simpson (1979) konnte ein Thymin in Position -3 und ein weiteres Thymin in Position +3 des kodogenen Stranges identifizieren, das durch irreversible Vernetzung ("crosslinks") an den σ-Faktor bzw. an die β-Untereinheit der RNA-Polymerase gebunden werden konnte und daher vermutlich eine Rolle bei der Initiation der Transkription spielt.

In der EcoRI-41-Sequenz steht ebenfalls ein Thymin in Position -3. In Position +3 wurde ein Cytosin gefunden, eine häufig anzutreffende Variante (vgl. Siebenlist, 1980). In Analogie zu den abgebildeten Promotorsequenzen wäre eine Transkriptionsinitiation vor allem am Adenin in Position +1 möglich (vgl. Abb. 19).

Es wird allgemein angenommen, daß sich Promotoren durch AT-reiche Sequenzen auszeichnen, die das lokale Auseinanderweichen (Schmelzen) der DNA-Stränge nach Binden der RNA-Polymerase erleichtern und damit die Transkription ermöglichen. Die abgebildete EcoRI-41-Sequenz hat eine AT-reiche Region zwischen den Positionen -13 und +2.

Die auffällige Sequenzhomologie zwischen bekannten Promotoren und dem bei 125,2 kb kartierten EcoRI-41-Ende kann dahingehend gedeutet werden, daß in vitro die Transkription des T4 Ligase-Gens an dieser Sequenz mit Promotorstruktur initiiert wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die EcoRI-Karte der T4 dC-DNA wurde aufgestellt; 64 von 71 EcoRI-Restriktionsschnitten wurden kartiert. Aus je zwei alternativen Reihenfolgen konnte die Aufeinanderfolge von BglII-, KpnI- und XhoI-Fragmenten festgelegt werden. Der BamHI-Schnitt und weitere XhoI-Schnitte wurden in Zusammenarbeit mit U. Rohr (Bochum) kartiert. In einer Feinkartierung dreier Regionen der T4 dC-DNA konnten 28 HindIII-, HpaII-, ClaI- bzw. HinfI-Schnitte festgelegt werden.

Die physikalische Karte der T4 dC-DNA wurde mit der genetischen Karte des Bakteriophagen T4 korreliert.

Fünf Bereiche der T4-DNA, die intensiv in vitro transkribiert werden, wurden zwischen 73,2 kb und 70,4 kb, 59,8 kb und 47,2 kb, 21,1 kb und 158 kb, 148,7 kb und 140,55 kb sowie zwischen 133,85 kb und 122,45 kb lokalisiert.

Der Promotor eines etwa 3900 Nukleotide langen in vitro-Transkripts wurde bei 148,5 kb, der entsprechende Terminator bei 144,6 kb kartiert. Diese sog. UpC-Transkriptionseinheit konnte den Genen das, 33, 59 und 32 zugeordnet werden. Ein Promotor des frd-Gens wurde bei 144,59 kb kartiert.

Es gelang nicht, den Promotor des UpC-Transkripts zu klonieren und zu sequenzieren, mögliche Ursachen werden diskutiert.

Drei T4 dC-DNA-HindIII-Restriktionsfragmente mit 1,9 kb, 1,2 kb und 0,8 kb aus dem Bereich des T4 Ligase-Gens wurden in dem Plasmid pBR322 kloniert. Sequenzanalysen der klonierten DNA ergaben eine mögliche Promotorsequenz des T4 Ligase-Gens bei 125,2 kb.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Barrell, B. G., Air, G. M., Hutchison, C.A.:
Overlapping genes in bacteriophage ϕX174.
Nature 264, 34-41 (1976)

Bautz, E. K. F., Hall, B. D.:
The isolation of T4-specific RNA on a DNA-cellulose column.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 400-408 (1962)

Bautz, F. A., Bautz, E. K. F.:
Mapping of deletions in a non-essential region of the phage T4 genome.
J. Mol. Biol. 28, 345-355 (1967)

Beck, E., Sommer, R., Auerswald, E. A., Kurz, C., Zink, B., Osterburg, G., Schaller, H.:
Nucleotide sequence of bacteriophage fd DNA.
Nucleic Acids Res. 5, 4495-4503 (1978)

Benzer, S.:
On the topography of the genetic fine structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 403-426 (1961)

Bertrand, K., Korn, L., Lee, F., Platt, T., Squires, C. L., Squires, C., Yanofsky, C.:
New features of the regulation of the tryptophan operon.
Science 189, 22-26 (1975)

Black, L. W., Gold, L. M.:
Pre-replicative development of the bacteriophage T4: RNA and protein synthesis in vivo and in vitro.
J. Mol. Biol. 60, 365-388 (1971)

Blatti, S. P., Ingles, C. J., Lindell, T. J., Morris, P. W., Weaver, R. F., Weinberg, F., Rutter, W. J.:
Structure and regulatory properties of eucaryotic RNA polymerase.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 649-657 (1970)

Blin, N., v. Gabain, A., Bujard, H.:
Isolation of large molecular weight DNA from agarose gels for further digestion by restriction enzymes.
FEBS Letters 53, 84-86 (1975)

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., Falkow, S.:
Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene 2, 95-113 (1977)

Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., Chambon, P.:
Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4853-4857 (1978)

Bujard, H., Hendrickson, H.E.:
Structure and function of the genome of coliphage T5. 1. The physical structure of the chromosome of T5+.
Eur. J. Biochem. 33, 517-528 (1973)

Carlson, K.:
Correlation between genetic map and map of cleavage sites for sequence-specific endonucleases SalI, KpnI, BglI and BamHI in bacteriophage T4 cytosine-containing DNA.
J. Virol. 36, 1-17 (1980)

Chaconas, G., van deSande, J. H.:
5'^{32}P labeling of RNA and DNA restriction fragments.
In: Methods in Enzymology (Grossman, L., ed.) Vol. 65, Nucleic Acids, Part I, pp. 75-85, Academic Press, New York (1980)

Chamberlin, M. J.:
Bacterial DNA-dependent RNA polymerase.
In: The Enzymes (Boyer, P. D., ed.) Vol. X, Protein synthesis, DNA synthesis and repair, RNA synthesis, Energy-linked ATPases, Synthetases, pp. 333-374, Academic Press, New York (1974)

Clewell, D. B.:
Nature of ColE1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloramphenicol.
J. Bacteriol. 110, 667-676 (1972)

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L.:
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114 (1972)

Commerford, S. L.:
Iodination of nucleic acids in vitro.
Biochemistry 10, 1993-2000 (1971)

Daegelen, P., Brody, E.:
Early bacteriophage T4 transcription. A diffusible product controls rIIA and rIIB RNA synthesis.
J. Mol. Biol. 103, 127-142 (1976)

Daniels, D. L., de Wet, J. R., Blattner, F. R.:
New map of bacteriophage λ DNA.
J. Virol. 33, 390-400 (1980)

Davidson, J. N., Waymouth, C.:
Tissue nucleic acids. 3. The nucleic acid and nucleotide content of liver tissue.
Biochem. J. 38, 379-385 (1944)

Denhardt, D. T.:
A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646 (1966)

Depew, R. E., Snopek, T. J., Cozzarelli, N. R.:
Characterization of a new class of deletions of the D-region of the bacteriophage T4 genome.
Virology 64, 144-152 (1975)

De Robertis, E. D. P., De Robertis, E. M. F. Jr.:
Cell and Molecular Biology
Saunders College, Holt, Rinehart and Winston, Philadelphia (1980)

Donelson, J. E., Wu, R.:
Nucleotide sequence analysis of deoxyribonucleic acid. VI. Determination of 3' terminal dinucleotide sequences of several species of duplex deoxyribonucleic acid using Escherichia coli deoxyribonucleic acid polymerase I.
J. Biol. Chem. 247, 4654-4660 (1972)

Downey, K. M., So, A. G.:
Studies on the kinetics of ribonucleic acid chain initiation and elongation.
Biochemistry 9, 2520-2525 (1970)

Dugaiczyk, A., Boyer, H. W., Goodman, H. M.:
Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures.
J. Mol. Biol. 96, 171-184 (1975)

Edmonds, M., Vaughan, M. H., Nakazoto, H.:
Poly(A) sequences in the hnRNA and rapidly labeled polysomal RNA of HeLa cells: possible evidence for a precursor relationship.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1336-1340 (1971)

Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., Ysebaert, M.:
Complete nucleotide sequence of SV40 DNA.
Nature 273, 113-120 (1978)

Frederick, R. J., Snyder, L.:
Regulation of anti-late RNA synthesis in bacteriophage T4: A delayed early control.
J. Mol. Biol. 114, 461-476 (1977)

Fuchs, E.:
The interdependence of magnesium with spermidin and phosphoenolpyruvate in an enzyme-synthesizing system in vitro.
Eur. J. Biochem. 63, 15-22 (1976)

Fukada, K., Otsuka, A., Abelson, J.:
A restriction map of the T4 transfer RNA gene cluster.
J. Mol. Biol. 137, 191-211 (1980a)

Fukada, K., Gossens, L., Abelson, J.:
The cloning of a T4 transfer RNA gene cluster.
J. Mol. Biol. 137, 213-234 (1980b)

Fukada, K., Abelson, J.:
DNA sequence of a T4 tRNA gene cluster.
J. Mol. Biol. 139, 377-391 (1980)

Gabain, v. A., Hayward, G. S., Bujard, H.:
Physical mapping of the HindIII, EcoRI, Sal and Sma restriction endonuclease cleavage fragments from bacteriophage T5 DNA.
Molec. Gen. Genet. 143, 279-290 (1976)

Gannon, F., O'Hare, K., Perrin, F., Le Pennec, J. P., Benoist, C., Cochet, M., Breathnach, R., Royal, A., Garapin, A., Cami, B., Chambon, P.:
Organization and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene.
Nature 278, 428-434 (1979)

Geiduschek, E. P., Sklar, J.:
Role of host RNA polymerase in phage development.
Nature 221, 833-836 (1969)

Gentz, R., Langner, A., Chang, A. C. Y., Cohen, S. N., Bujard, H.:
Cloning and analysis of strong promotors is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4936-4940 (1981)

Gilbert, W.:
Starting and stopping sequences for the RNA polymerase.
In: RNA Polymerase, (Losick, R., Chamberlin, M., eds.) pp. 193-205, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1976)

Glynn, I. M., Chappell, J. B.:
A simple method for the preparation of ^{32}P-labelled adenosinetriphosphate of high specific activity.
Biochem. J. 90, 147-149 (1964)

Gold, L., O'Farrell, P. Z., Russel, M.:
Regulation of gene 32 expression during bacteriophage T4 infection of Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 251, 7251-7262 (1976)

Goldfarb, A., Daniel, V.:
Mapping of transcription units in the bacteriophage T4 tRNA gene cluster.
J. Mol. Biol. 146, 393-421 (1981)

Goldfarb, A.:
In vitro transcription of bacteriophage T4 tRNA gene cluster from two different promotors.
Nucleic Acids Res. 9, 519-527 (1981)

Goldfarb, A., Burger, H. J.:
Mapping of in vitro transcription units and identification of primary transcripts of the D region of bacteriophage T4.
Nucleic Acids Res. 9, 2791-2800 (1981)

Gram, H.:
Kartierung früher Promotoren und Transkriptionseinheiten auf dem Genom des Bakteriophagen T4.
Diplomarbeit, an der Abteilung für Biologie der Ruhr-Universität Bochum (1982)

Grasso, R. J., Buchanan, J. M.:
Synthesis of early RNA in bacteriophage T4-infected Escherichia coli B.
Nature 224, 882-885 (1969)

Grosschedl, R., Birnstiel, M. L.:
Identification of regulatory sequences in the prelude sequences of an H2A histone gene by the study of specific deletion mutants in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1432-1436 (1980)

Guha, A., Szybalski, W.:
Fractionation of the complementary strands of coliphage T4 DNA based on the asymmetric distribution of the polyU and polyUG binding sites.
Virology 34, 608-616 (1968)

Hänggi, U. J., Zachau, H. G.:
Isolation and characterization of DNA fragments containing the dihydrofolate reductase gene of coliphage T4.
Gene 9, 271-285 (1980)

Haselkorn, R., Vogel, M., Brown, R. D.:
Conservation of the Rifamycin sensitivity of transcription during T4 development.
Nature 221, 836-838 (1969)

Hercules, K., Wiberg, J. S.:
Specific suppression of mutations in gene 46 and 47 by das, a new class of mutations in bacteriophage T4 D.
J. Virol. 8, 603-612 (1971)

Herrmann, R., Wood, W. B.:
Assembly of bacteriophage T4 tail fibers: identification and characterisation of the nonstructural protein gp 57.
Molec. Gen. Genet. 184, 125-132 (1981)

Herrmann, R.:
Nucleotide sequence of the bacteriophage T4 gene 57 and a deduced amino acid sequence.
Nucleic Acids Res. 10, 1105-1112 (1982)

Horvitz, H. R.:
Control by bacteriophage T4 of two sequentional phosphorylations of the α subunit of E.coli RNA polymerase.
J. Mol. Biol. 90, 727-738 (1974 a)

Horvitz, H. R.:
Bacteriophage T4 mutants deficient in alteration and modification of the E.coli RNA polymerase.
J. Mol. Biol. 90, 739-750 (1974 b)

Jayaraman, R.:
Transcription of bacteriophage T4 DNA by Escherichia coli RNA polymerase in vitro: Identification of some immediate-early and delayed-early genes.
J. Mol. Biol. 70, 253-263 (1972)

Kaplan, D. A., Nierlich, D. P.:
Cleavage of nonglucosylated bacteriophage T4 deoxyribonucleic acid by restriction endonuclease EcoRI.
J. Biol. Chem. 250, 2395-2397 (1975)

Kaplan, D. A., Russo, R., Wilcox, G.:
An improved horizontal slab gel electrophoresis apparatus for DNA separation.
Anal. Biochem. 78, 235-243 (1977)

Katz, L., Kingsbury, D. T., Helinski, D. R.:
Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolite repression of the plasmid deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex.
J. Bacteriol. 114, 577-591 (1973)

Kiko, H., Niggemann, E., Rüger, W.:
Physical mapping of the restriction fragments obtained from bacteriophage T4 dC-DNA with the restriction endonucleases SmaI, KpnI and BglII.
Molec. Gen. Genet. 172, 303-312 (1979)

Kim, J. S., Davidson, N.:
Electron microscope heteroduplex study of sequence relations of T2, T4, and T6 bacteriophage DNAs.
Virology 57, 93-111 (1974)

Konkel, D. A., Tilghman, S. M., Leder, P.:
The sequence of the chromosomal mouse ß globin major gene: homologies in capping, splicing and poly (A) sites.
Cell 15, 1125-1132 (1978)

Kozloff, L. M., Zorzopulos, J.:
Dual functions of bacteriophage T4 D gene 28 product: Structural component of the viral tail baseplate central plug and cleavage enzyme for folyl polyglutamates. I. Identification of T4 D gene 28 product in the tail plug.
J. Virol. 40, 635-644 (1981)

Krisch, H. M., Van Houwe, G., Belin, D., Gibbs, W., Epstein, R. H.:
Regulation of the expression of bacteriophage T4 genes 32 and 43.
Virology 78, 87-98 (1977)

Krisch, H. M., Selzer, G. B.:
Construction and properties of a recombinant plasmid containing gene 32 of bacteriophage T4 D.
J. Mol. Biol. 148, 199-218 (1981)

Kuhn, S., Anitz, H. J., Starlinger, P.:
Close vicinity of IS1 integration sites of the leader sequence of the gal operon of E.coli.
Molec. Gen. Genet. 167, 235-241 (1979)

Kupersztoch-Portnoy, Y. M., Lovett, M. A., Helinski, D. R.:
Strand and site specificity of the relaxation event for the relaxation complex of the antibiotic resistance plasmid R6K.
Biochemistry 13, 5484-5490 (1974)

Kutter, E., Beug, A., Sluss, R., Jensen, L., Bradley, D.:
The production of undegraded cytosine-containing DNA by bacteriophage T4 in the absence of dCTPase and endonucleases II and IV, and its effects on T4-directed protein synthesis.
J. Mol. Biol. 99, 591-607 (1975)

Kutter, E. M., Bradley, D., Schenck, R., Guttman, B. S., Laiken, R.:
Bacteriophage T4 alc gene product: General inhibitor of transcription from cytosine-containing DNA.
J. Virol. 40, 822-829 (1981)

Landy, A., Ruedisueli, E., Robinson, L., Foeller, C., Ross, W.:
Digestion of deoxyribonucleic acids from bacteriophage T7, λ, and ϕ80h with site-specific nucleases from Hemophilus influenzae strain Rc and Rd.
Biochemistry 13, 2134-2142 (1974)

Lehman , I. R., Pratt, E. A.:
On the structure of the glucosylated hydroxymethylcytosine nucleotides of coliphages T2, T4, and T6.
J. Biol. Chem. 235, 3254-3255 (1960)

Lewin, B. M.:
Gene Expression, Vol. 2: Eucaryotic Chromosomes
Wiley & Sons, New York (1980)

Lovett, M. A., Helinski, D. R.:
Method for the isolation of the replication region of a bacterial replicon: Construction of a mini-F' Km plasmid.
J. Bacteriol. 127, 982-987 (1976)

Macgregor, H. C., Mizuno, S.:
In situ hybridization of "nicktranslated" ^{3}H ribosomal DNA to chromosomes from salamanders.
Chromosoma 54, 15-25 (1976)

Maniatis, T., Ptashne, M., Backman, K., Kleid, D., Flashman, S., Jeffrey, A., Maurer, R.:
Recognition sequences of repressor and polymerase in the operators of bacteriophage Lambda.
Cell 5, 109-113 (1975)

Marsh, R. C., Hepburn, M. L.:
Map of restriction sites on bacteriophage T4 cytosine-containing DNA for endonucleases BamHI, BglII, KpnI, PvuI, SalI, and XbaI.
J. Virol. 38, 104-114 (1981)

Mattson, T., Van Houwe, G., Bolle, A., Selzer, G., Epstein, R.:
Genetic identification of cloned fragments of bacteriophage T4 DNA and complementation by some clones containing early T4 genes.
Molec. Gen. Genet. 154, 319-326 (1977)

Mattson, T., Van Houwe, G., Epstein, R. H.:
Isolation and characterization of conditional lethal mutations in the mot gene of bacteriophage T4.
J. Mol. Biol. 126, 551-570 (1978)

Maxam, A. M., Gilbert, W.:
A new method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977)

Maxam, A. M., Gilbert, W.:
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.
In: Methods in Enzymology, Vol. 65, Nucleic Acids Part I, (Grossman, L., ed.), pp. 499-560, Academic Press, New York (1980)

Mazin, A. L., Sulimova, G. E., Vanyushin, B. F.:
Granulated hydroxyapatite: preparation and chromatographic properties.
Anal. Biochem. 61, 62-71 (1974)

McDonnell, M. W., Simon, M. N., Studier, F. W.:
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol. 110, 119-146 (1977)

Milanesi, G., Brody, E. N., Grau, O., Geiduschek, E. P.:
Transcription of the bacteriophage T4 template in vitro: Separation of "delayed early" from "immediate early" transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 181-188 (1970)

Mileham, A. J., Revel, H. R., Murray, N. E.:
Molecular cloning of the T4 genome; organization and expression of the frd - DNA ligase region.
Molec. Gen. Genet. 179, 227-239 (1980)

Mosig, G.:
Genetic map of bacteriophage T4.
In: Genetic Maps, Vol. 1, (Brien, J. O., ed.), p. 20, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1980)

Murray, N. E., Brammar, W. J., Murray, K.:
Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants.
Molec. Gen. Genet. 150, 53-61 (1977)

Murray, N. E., Murray, K.:
Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments.
Nature 251, 476-481 (1979)

Niggemann, E., Green, I., Meyer, H. P., Rüger, W.:
Physical mapping of bacteriophage T4.
Molec. Gen. Genet. 184, 289-299 (1981)

Notani, G. W.:
Regulation of bacteriophage T4 gene expression.
J. Mol. Biol. 73, 231-249 (1973)

O'Farrell, P. Z., Gold, L. M.:
Bacteriophage T4 gene expression. Evidence for two classes of prereplicative cistrons.
J. Biol. Chem. 248, 5502-5511 (1973a)

O'Farrell, P. Z., Gold, L. M.:
Transcription and translation of prereplicative bacteriophage T4 genes in vitro.
J. Biol. Chem. 248, 5512-5519 (1973b)

O'Farrell, P. H., Kutter, E., Takanishi, M.:
A restriction map of the bacteriophage T4 genome.
Molec.Gen. Genet. 179, 421-435 (1980)

Oliver, D. B., Crowther, R. A.:
DNA sequence of the tail fiber genes 36 and 37 of bacteriophage T4.
J. Mol. Biol. 153, 545-568 (1981)

Peacock, A. C., Dingman, C. W.:
Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels.
Biochemistry 7, 668-674 (1968)

Perry, R. P., Kelly, D. E.:
Existence of methylated mRNA in mouse L cells.
Cell 1, 37-42 (1974)

Platt, T.:
Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of E.coli.
Cell 24, 10-23 (1981)

Pribnow, D.:
Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promotor.
Proc. Natl. Acad.Sci. USA 72, 784-788 (1975)

Pribnow, D., Sigurdson, D. C., Gold, L., Singer, B. S., Napoli, C., Brosius, J., Dull, T. J., Noller, H. F.:
rII cistrons of bacteriophage T4. DNA sequence around the intercistronic divide and positions of genetic landmarks.
J. Mol. Biol. 149, 337-376 (1981)

Rabussay, D., Geiduschek, E. P.:
The T-even bacteriophages.
In: Comprehensive Virology, Vol. 8, Regulation and Genetics of Bacterial DNA Viruses, (Fraenkel-Conrat, H., Wagner, R. R., eds.) , pp. 59-122, Plenum Press, New York (1977a)

Rabussay, D., Geiduschek, E. P.:
Phage T4-modified RNA polymerase transcribes T4 late genes in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5305-5309 (1977b)

Rahmsdorf, H. J., Deusser, E., Herrlich, P., Schweiger, M., Stoeffler, G., Wittmann, H. G.:
Ribosomes after T4-infection.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 746 (1972)

Reid, M. S., Bielinski, R. L.:
A simple apparatus for vertical flat sheet polyacrylamid gel electrophoresis.
Anal. Biochem. 22, 374-381 (1968)

Revel, H. R.:
Molecular cloning of the T4 genome: Organization and expression of the tail fiber gene cluster 34-38.
Molec. Gen. Genet. 182, 445-455 (1981)

Roberts, R. J.:
Restriction endonucleases.
Crit. Rev. Biochem. 4, 123-164 (1976)

Roberts, R. J.:
Restriction and modification enzymes and their recognition sequences.
Gene 8, 329-343 (1980)

Rohrer, H., Zillig, W., Mailhammer, R.:
ADP-ribosylation of DNA-dependent RNA polymerase of E.coli by an NAD^+:protein ADP-ribosyltransferase from bacteriophage T4.
Eur. J. Biochem. 60, 227-238 (1975)

Rosenberg, M., Court, D.:
Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription.
Ann. Rev. Genet. 13, 319-353 (1979)

Rüger, W.:
Transcription of bacteriophage T4 DNA in vitro: Selective initiation with dinucleotides.
Eur. J. Biochem. 88, 109-117 (1978)

Rüger, W., Neumann, M., Rohr, U., Niggemann, E.:
The complete maps of BglII, SalI and XhoI restriction sites on T4 dC-DNA.
Molec. Gen. Genet. 176, 417-425 (1979)

Russel, M., Gold, L., Morrissett, H., O'Farrell, P. Z.:
Translational, autogenous regulation of gene 32 expression during bacteriophage T4 infection.
J. Biol. Chem. 251, 7263-7270 (1976)

Salser, W., Bolle, A., Epstein, R.:
Transcription during bacteriophage T4 development: A demonstration that distinct subclasses of the "early" RNA appear at different times and that some are "turned off" at late times.
J. Mol. Biol. 49, 271-295 (1970)

Sanger, F., Coulson, A. R.:
A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.
J. Mol. Biol. 94, 441-448 (1975)

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.:
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977a)

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., Smith, M.:
Nucleotide sequence of bacteriophage ΦX174 DNA.
Nature 265, 687-695 (1977b)

Selzer, G., Bolle, A., Krisch, H., Epstein, R.:
Construction and properties of recombinant plasmids containing the rII genes of bacteriophage T4.
Molec. Gen. Genet. 159, 301-309 (1978)

Shaw, D. C., Walker, J. E., Northrop, F. D., Barrell, B. G., Godson, G. N., Fiddes, J. C.:
Gene K, a new overlapping gene in bacteriophage G4.
Nature 272, 510-515 (1978)

Shine, J., Dalgarno, L.:
The 3' terminal sequence of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA: Complementary to nonsense triplets and ribosome binding site.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342-1346 (1974)

Siebenlist, U.:
Nucleotide sequence of three major early promoters of bacteriophage T7.
Nucleic Acids Res. 6, 1895-1907 (1979)

Siebenlist, U., Simpson, R. B., Gilbert, W.:
E.coli RNA polymerase interacts homologously with two different promoters.
Cell 20, 269-281 (1980)

Simpson, R. B.:
The molecular topographie of RNA polymerase - promoter interaction.
Cell 18, 277-285 (1979)

Sirotkin, K., Wei, J., Snyder, L.:
T4 bacteriophage-coded RNA polymerase subunit blocks host transcription and unfolds the host chromosome.
Nature 265, 28-32 (1977)

Sirotkin, K., Cooley, W., Runnels, J., Snyder, L.:
A role in true late gene expression for the bacteriophage T4 5' polynucleotide kinase 3' phosphatase.
J. Mol. Biol. 123, 221-233 (1978)

Smith, F. L., Haselkorn, R.:
Proteins associated with ribosomes in T4 infected E.coli.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 91-94 (1969)

Smith, H. O., Birnstiel, M. L.:
A simple method for DNA restriction site mapping.
Nucleic Acids Res. 3, 2387-2398 (1976)

Snyder, L., Gold, L., Kutter, E.:
A gene of bacteriophage T4 whose product prevents true late transcription on cytosine-containing T4 DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3098-3102 (1976)

Southern, E. M.:
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

Stevens, A. V.:
New small polypeptides associated with DNA dependent RNA polmerase of E.coli after infection with bacteriophage T4.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 603-607 (1972)

Streisinger, G., Edgar, R. S., Denhardt, G. H.:
Chromosome structure in phage T4. I. Circularity of the linkage map.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 51, 775-779 (1964)

Studier, F. W.:
Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels.
J. Mol. Biol. 79, 237-248 (1973)

Summers, W. C., Brunovski , I., Hyman, R. W.:
The process of infection with coliphage T7.
VII. Characterization and mapping of the major in vivo transcription products of the early region.
J. Mol. Biol. 74, 291-300 (1973)

Sutcliffe, J. G.:
pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long.
Nucleic Acids Res. 5, 2721-2728 (1978)

Thermes, C., Daegelen, P., De Franciscis, V., Brody, E.:
In vitro system for induction of delayed early RNA of bacteriophage T4.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2569-2573 (1976)

Thomas, C. A. Jr., Abelson, J.:
The isolation and characterization of DNA from bacteriophage.
In: Procedures in Nucleic Acid Research (Cantoni, G. L., Davies, D. R., eds.,), pp. 553-561, Harper & Row, New York (1960)

Thomas, C. A. Jr.:
The arrangement of information in DNA molecules.
J. Gen. Physiol. 49, 143-169 (1966)

Travers, A. A.:
Positive control of transcription by a bacteriophage T4 σ factor.
Nature 225, 1009-1012 (1970)

Velten, J., Fukada, K., Abelson, J.:
In vitro construction of bacteriophage λ and plasmid DNA molecules containing DNA fragments from bacteriophage T4.
Gene 1, 93-106 (1976)

Wahl, G. M., Stern, M., Stark, G. R.:
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization using dextran sulfate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3683-3687 (1979)

Wilson, G. G., Tanyashin, V. I., Murray, N. E.:
Molecular cloning of fragments of bacteriophage T4 DNA.
Molec. Gen. Genet. 156, 203-214 (1977)

Wilson, G. G., Murray, N. E.:
Molecular cloning of the DNA ligase gene from bacteriophage T4. I. Characterisation of the recombinants.
J. Mol. Biol. 132, 471-491 (1979)

Wilson, G. G., Neve, R. L., Edlin, G. J.:
The BamHI restriction site in the bacteriophage T4 chromosome is located in or near gene 8.
Genetics 93, 285-296 (1979)

Wilson, G.G.:
SacII and XmaIII cleavage sites in phage T4 DNA.
Evergreen T4 Meeting, p. 27 (1981)

Wood, W. B., Revel, H. R.:
The genome of bacteriophage T4.
Bacteriological Reviews 40, 847-868 (1976)

Wu, R., Geiduschek, E. P., Cascino, A.:
The role of replication proteins in the regulation of bacteriophage T4 transcription. II. Gene 45 and late transcription uncoupled from replication.
J. Mol. Biol. 96, 539-562 (1975)

Wyatt, G. R., Cohen, S. S.:
A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids.
Nature 170, 1072-1073 (1952)

Yanofsky, C.:
Attenuation in the control of expression of bacterial operons.
Nature 289, 751-758 (1981)

Yee, J. K., Marsh, R. C.:
Alignment of a restriction map with the genetic map of bacteriophage T4.
J. Virol. 38, 115-124 (1981)

Young, E. T.:
Analysis of bacteriophage T4 chloramphenicol RNA by DNA-RNA hybridization and by cell-free protein synthesis, and its effect of Escherichia coli polarity-suppressing alleles on its synthesis.
J. Mol. Biol. 96, 393-424 (1975)

Young, E. T., Mattson, T., Selzer, G., Van Houwe, G., Bolle, A., Epstein, R.:
Bacteriophage T4 gene transcription studied by hybridization to cloned restriction fragments.
J. Mol. Biol. 138, 423-445 (1980)

Young, E. T., Menard, R. C.:
Sizes of bacteriophage T4 early mRNA's separated by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and identified by in vitro translation and by hybridization to recombinant T4 plasmids.
J. Virol. 40, 772-789 (1981)

Young, E. T., Menard, R. C., Harada, J.:
Monocistronic and polycistronic bacteriophage T4 gene 23 messages.
J. Virol. 40, 790-799 (1981)

7. ANHANG

Tabellen und physikalische Karte des Phagen T4

Tabelle 10: Restriktionskarte der T4 dC-DNA

Enzym[1]	Fragment[2]	MW (kb)[3]	Position[4]	Bezeichnung (Abk.)[5]
BamHI	1	166,0	85,4	Bam
SmaI	4	2,3	157,8	Sm 5
	3b	3,4	155,5	Sm 4
	3a	3,4	152,1	Sm 3
	2	15,6	148,7	Sm 2
	1*	141,3	133,1	Sm 1
KpnI	1c	36,8	47,2	K 3
	5	1,6	10,4	K 2
	3*	14,5	8,8	K 1
	2	23,7	160,3	K 7
	1a	46,1	136,6	K 6
	4	3,3	90,5	K 5
	1b	40,0	87,2	K 4
SalI	4	15,4	73,2	S 5
	3	24,0	57,8	S 4
	5	9,2	33,8	S 3
	7	4,1	24,6	S 2
	2b*	22,7	20,5	S 1
		13,04	163,5	S 9
	6	7,17	150,76	S 8
	2a	31,59	143,59	S 7
	1	38,8	112,0	S 6

1) Zur Kartierung dieser Restriktionsschnitte s. 3.1.

2) Die Fragmentbezeichnung bezieht sich auf das Restriktionsmuster der T4 "rIIH23"-DNA (vgl. 3.2.).

3) Die Molekulargewichtsangaben beziehen sich auf deletionsfreie T4-DNA oder, im Fall der HaeII- und EcoRI-Fragmente auf T4 saΔ9-DNA.

4) Die Position gibt die Entfernung des Restriktionsschnitts zum genetischen Nullpunkt in kb an.

Tabelle 10: Fortsetzung

Enzym[1]	Fragment[2]	MW (kb)[3]	Position[4]	Bezeichnung (Abk.)[5]
BglII	2b	17,4	39,4	B 3
	3	14,2	22,0	B 2
	4*	18,0	7,8	B 1
	10	1,2	155,8	B 13
	2a	17,4	154,6	B 12
	6	8,05	137,2	B 11
	8b	4,25	129,15	B 10
	7b	5,45	124,9	B 9
	7a	5,45	119,45	B 8
	5	10,6	114,0	B 7
	9	3,3	103,4	B 6
	8a	4,2	100,1	B 5
	1	56,5	95,9	B 4
XhoI	7	9,6	78,1	Xh 9
	11	4,1	68,5	Xh 8
	3	15,5	64,4	Xh 7
	5a	11,5	48,9	Xh 6
	12	0,9	37,4	Xh 5
	9a	7,2	36,5	Xh 4
	8	9,0	29,3	Xh 3
	1	19,2	20,3	Xh 2
	13*	4,7	1,1	Xh 1
	6	10,8	162,4	Xh 17
	4a	12,8	151,6	Xh 16
	4b	12,8	138,8	Xh 15
	10	5,9	126,0	Xh 14
	5b	11,4	120,1	Xh 13
	9c	6,8	108,7	Xh 12
	9b	6,9	101,9	Xh 11
	2	16,9	95,0	Xh 10

5) Die in der Tabelle angegebenen abgekürzten Bezeichnungen der Restriktionsschnitte wurden in den Abbildungen der vorliegenden Arbeit benutzt. Die Schnittstellen wurden fortlaufend vom genetischen Nullpunkt aus durchnumeriert.

6) Zur Kartierung dieser Restriktionsschnitte s. die Kapitel 3.2., 3.4. und 3.5.

* Fragmente, die je nach verwendeter Deletion im Bereich der rII-Region Veränderungen ihres Molekulargewichts erfahren, wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Tabelle 10: Fortsetzung

Enzym[1]	Fragment[2]	MW (kb)[3]	Position[4]	Bezeichnung (Abk.)[5]
XbaI	3	13,1	79,5	X 13
	2c	14,9	66,4	X 12
	16	2,3	51,5	X 11
	10	5,4	49,2	X 10
	18	1,4	43,8	X 9
	19	1,3	42,4	X 8
	14	2,9	41,1	X 7
	13	3,6	38,2	X 6
	4	12,4	34,6	X 5
	11	4,2	22,2	X 4
	17	2,2	18,0	X 3
	15	2,7	15,8	X 2
	2a*	14,7	13,1	X 1
		6,0	164,8	X 24
	21	0,6	158,8	X 23
	8	7,4	158,2	X 22
	1	17,3	150,8	X 21
	6	9,2	133,5	X 20
	20	1,3	124,3	X 19
	7	7,9	123,0	X 18
	12	4,0	115,1	X 17
	2b	14,5	111,1	X 16
	9	6,1	96,6	X 15
	5	11,0	90,5	X 14

Tabelle 10: Fortsetzung

Enzym[1]	Fragment[2]	MW (kb)[3]	Position[4]	Bezeichnung (Abk.)[5]
HaeII			83,6	H 21
	26	0,9	82,7	H 20
	{16a}	3,0		
	{25}	0,9		
			78,8	H 18
	20a	1,9	76,9	H 17
	14	3,4	73,5	H 16
	19a	2,0	71,5	H 15
	13	3,4	68,1	H 14
	16b	3,0	65,1	H 13
	3	11,8	53,3	H 12
	4	10,3	43,0	H 11
	2a	12,0	31,0	H 10
	9	5,4	25,6	H 9
	7	6,9	18,7	H 8
	17b	2,8	15,9	H 7
	31	0,6	15,3	H 6
	15	3,3	12,0	H 5
	{29}	0,8		
	{30}	0,6		
			10,6	H 3
	8	5,6	5,0	H 2
	12	4,4	0,6	H 1
	16c*	2,9	161,2	H 41
	11	4,5	156,7	H 40
	24	0,9	155,8	H 39
	21b	1,7	154,1	H 38
	32	0,5	153,6	H 37
	1	14,7	138,9	H 36
	6	7,9	131,0	H 35
	5	9,0	122,0	H 34
	23	1,0	121,0	H 33
	18	2,2	118,8	H 32
	27	0,8	118,0	H 31
	10b	5,0	113,0	H 30
	2b	12,0	101,0	H 29
	22	1,2	99,8	H 28
	21a	1,7	98,1	H 27
	20b	1,9	96,2	H 26
	19c	2,0	94,2	H 25
	{17a}	2,8		
	{28}	0,8		
			90,6	H 23
	10a	5,0	85,6	H 22
	19b	2,0		

Tabelle 10: Fortsetzung

Enzym[1]	Fragment[2]	MW (kb)[3]	Position[3]	Bezeichnung (Abk.)[4]
			82,7	E 32
EcoRI	25	1,9	80,8	E 31
	7	4,8	76,0	E 30
	5	5,6	70,4	E 29
	40	0,55	69,85	E 28
	10	3,95	65,9	E 27
	27	1,7	64,2	E 26
	(24	2,0		
	26	1,8		
	39)	0,6	59,8	E 23
	8	4,7	55,1	E 22
	34	1,1	54,0	E 21
	1	11,8	42,2	E 20
	36	0,9	41,3	E 19
	2	6,3	35,0	E 18
	38	0,7	34,3	E 17
	4	5,7	28,6	E 16
	30	1,45	27,15	E 15
	32	1,25	25,9	E 14
	26	1,8	24,1	E 13
	17	3,0	21,1	E 12
	6	4,8	16,3	E 11
	37	0,8	15,5	E 10
	36	0,9	14,6	E 9
	18	2,75	11,85	E 8
	32	1,25	10,6	E 7
	28	1,6	9,0	E 6
	32	1,25	7,75	E 5
	38	0,7	7,05	E 4
	29	1,5	5,55	E 3
	19	2,7	2,85	E 2
	43	0,35	2,5	E 1
	9b*	4,15	161,85	E 71
	(36	0,9		
	37	0,8		
	38	0,7		
	38	0,7		
	41	0,5		
	44)	0,25	158,0	E 65
	16	3,1	154,9	E 64
	23	2,05	152,85	E 63
	37	0,8	152,05	E 62
	45	0,2	151,85	E 61
	34	1,1	150,75	E 60
	14	3,25	147,5	E 59
	9a	4,25	143,25	E 58
	19	2,7	140,55	E 57
	38	0,7		

Tabelle 10: Fortsetzung

Enzym[1]	Fragment[2]	MW (kb)[3]	Position[4]	Bezeichnung (Abk.)[5]
EcoRI			139,85	E 56
	17	3,0	136,85	E 55
	27	1,7	135,15	E 54
	31	1,3	133,85	E 53
	21	2,2	131,65	E 52
	46	0,15	131,5	E 51
	33	1,15	130,35	E 50
	15	3,15	127,2	E 49
	29	1,5	125,7	E 48
	42	0,45	125,25	E 47
	41	0,5	124,75	E 46
	20	2,3	122,45	E 45
	6	4,8	117,65	E 44
	3	6,1	111,55	E 43
	12	3,7	107,85	E 42
	22	2,15	105,7	E 41
	12	3,7	102,0	E 40
	13	3,3	98,7	E 39
	39	0,6	98,1	E 38
	29	1,5	96,6	E 37
	36	0,9	95,7	E 36
	5	5,6	90,1	E 35
	41	0,5	89,6	E 34
	16	3,1	86,5	E 33
	11	3,8		

Tabelle 10: Fortsetzung

Enzym[6]	Position[4]	Bezeichnung (Abk.)[5]
ClaI	150,6	Cla
HindIII	150,3	Hi
HindIII	149,65	Hi
ClaI	149,45	Cla
HpaII	148,7	Hp
HinfI	148,55	Hif
HinfI	148,53/148,52	Hif
HinfI	148,5	Hif
HindIII	148,25	Hi
HinfI	148,15	Hif
HinfI	147,95	Hif
HinfI	147,83	Hif
HpaII	147,62	Hp
HpaII	147,35	Hp
HpaII	147,3	Hp
HindIII	147,3	Hi
HpaII	146,25	Hp
HpaII	146,0	Hp
ClaI	145,85	Cla
HindIII	144,77	Hi
HindIII	143,93	Hi
HindIII	126,0	Hi
ClaI	124,4	Cla
HindIII	124,1	Hi
HindIII	122,9	Hi
HindIII	122,1	Hi
HindIII	0,85	Hi
HindIII	0,45	Hi
HindIII	165,6	Hi

Tabelle 11: Genetische Karte des Phagen T4

Genort[1]	Position[2]	Genprodukt ($MW \times 10^3 D$)	Genprodukt/Funktion	Promotor-klasse[3]	Referenz[4]
rIIA	0 - 2,32	83	Membran-Protein	E	
(m = sum)				(E oder Q)	
(rc)				(E oder Q)	
60	3,43- 3,88	16	DNA-Topoisomerase-Untereinheit	E	
39	3,88- 5,59	61		E	
go9H	5,87				
(gof)					
(comCα)					
pla CTr 5X	6,06			(E oder Q)	
cef	6,25- 6,75	18		(E oder Q)	
p 12K	6,75- 7,09	12		(E oder Q)	
(pse F)			5'Phosphatase	(E oder Q)	
(dex A)			Exonuklease A	(E oder Q)	
(sud)				(E oder Q)	
dda	10,81- 11,23	15	DNA-Helikase	(E oder Q)	
mod	11,23- 11,73		Adenylribosylierung der RNA-Polymerase	(E oder Q)	
56	17,63- 18,05	15	dCTPase, dUTPase	(E oder Q)	
58 =61	19,5 - 20,69		DNA-Replikations-Initiation	(E oder Q)	
41	20,81- 22,43	58		Q	
40	22,43- 22,93	18	Löslichkeit von gp20	(Q)	
(sp = rIV)				(E oder Q)	
(uvsx = ddsA)			DNA-Reparatur	(E oder Q)	
βgt	23,96- 25,23		β-Glucosyltransfersae	(E oder Q)	
42	25,23- 25,93	25	dC-Hydroxymethylase	E	
imm	26,27			(E oder Q)	
43	26,52- 29,66	112	DNA-Polymerase	E, Q	
regA	29,66- 30,0	12	Regulation der frühen Proteinsynthese	(E oder Q)	

Tabelle 11: Fortsetzung

Genort[1]	Position[2]	Genprodukt (MWx10³D)	Genprodukt/Funktion	Promotor-klasse[3]	Referenz[4]
62	30,0 - 30,56	20	DNA-Replikations-Protein	(E)	
44	30,56- 31,51	35		(E)	
45	31,51- 32,27	27	DNA-Replikation, bindet an RNA-Polymerase	(E)	
46	32,27- 34,26	71	Rekombination?	(E)	
47	34,26- 35,3	37	Rekombination?	(E)	
αgt	38,62		α-Glucosyltransferase	(E oder Q)	
gor 2	39,43			(E oder Q)	
55	40,43- 41,05	22	bindet an RNA-Polymerase	Q	
49	44,3 - 45,7	50	Nuklease	(E oder Q)	
nrdC	48,52- 48,81	10,4	Thioredoxin	(E oder Q)	
(su 30)				(E oder Q)	
(dam (T2))			DNA-Adenin-Methylase von T2	(E oder Q)	
arn	55,0		Anti-rgl-Nuklease	(E oder Q)	
rI	59,8				
tk	60,1 - 60,65		Thymidin-Kinase		
vs	60,7 - 61,2		Modifikation der Valyl-tRNA-Synthese	E	
regB	62,0			(E oder Q)	
V = denV	63,13		Endonuklease V	(E oder Q)	
stI				(E oder Q)	
stIII				(E oder Q)	
ipII	64,8 - 65,05	9	Internes Protein II	E	
ipIII	65,05- 65,72	24	Internes Protein III	E, Q	
e	65,72- 66,25	19	Endolysin	E, Q	
tRNA	69,95- 70,3		1, 2, arg, gly, ser	Q	
tRNA	70,9 - 71,55		pro, ileu, thr, leu, glu	Q	
ipI	72,0 - 72,36	13	Internes Protein I	E	

Tabelle 11: Fortsetzung

Genort[1]	Position[2]	Genprodukt (MWx10^{3}D)	Genprodukt/Funktion	Promotor-klasse (E oder Q)[3]	Referenz[4]
(hm)					
57	73,14- 73,62	6	Morphogenese	Q	Herrmann & Wood, 1981
1	73,62- 74,24	22	dHMP-Kinase	Q	
3	74,24- 75,05	29	Schwanzfaserhülle	L	
2	75,35		Kopfabschlußprotein	(L)	
64	75,7		Kopfabschlußprotein	(L)	
50	76,25		Kopfabschlußprotein	L	
65	76,55		Kopfabschlußprotein	(L)	
4	76,85		Kopfabschlußprotein	(L)	
53	77,2 - 77,85	23	Basisplatte	L	
5	77,85- 78,85	37	Basisplatte	L	
6	78,85- 81,05	78	Basisplatte	L	
7	81,05- 84,6	127	Basisplatte	L	
8	84,6 - 85,75	39	Basisplatte	L	
9	85,75- 86,6	30	Basisplatte	L	
10	86,6 - 89,05	88	Basisplatte	L	
11	89,05- 89,75	25	Basisplatte	L	
12	89,75- 91,35	57	Kurze Schwanzfiber	L	
wac	91,35- 92,82	52	Bart-(whisker-)Antigen	(L)	
13	92,82- 93,71	33	Kopfabschlußprotein	L	
14	93,71- 94,53	30	Kopfabschlußprotein	L	
15	94,53- 95,4	32	Schwanzabschlußprotein	L	
16	95,55		Schwanzabschlußprotein	(L)	
17 = q	95,95- 97,85	69	Kopfabschlußprotein	L	
18	97,85- 99,9	70	Schwanzfaserhülle	L	
19	99,9 -100,4	20	Schwanzkernprotein	L	
20	100,4 -102,1	63	Verschlußprotein	L	
21	102,1 -102,8	25	Reifungs-Protease	L	
22	102,8 -103,7	32	Kern des Kopfzusammenbaus	L	

Tabelle 11: Fortsetzung

Genort[1]	Position[2]	Genprodukt (MWx103D)	Genprodukt/Funktion	Promotor-klasse[3]	Referenz[4]
23	103,7 -105,24	55	Haupt-Kopfprotein	L	
24 = os	105,3 -106,6	47	Neben-Kopfprotein	L	
uvsy = fdsB				(L)	
uvsw				(L)	
(dar)				(L)	
(hoc)	111,23-112,35	40	Neben-Kapsidprotein		
25	112,35-112,77	15	Basisplatte	L	
26	113,18		Basisplatte	(L)	
51	114,24		Basisplatte	L	
27	114,54-115,88	48	Basisplatte	L	
28	115,88-116,55	24	Basisplatte	L	Kozloff & Zorzopulos, 1981
29	116,55-118,71	77	Basisplatte	L	
48	118,83-119,8	37	Basisplatte	L	
54	119,99-121,0	36	Basisplatte	L	
alt	121,8 -123,5	61	Adenylribosylierung der RNA-Polymerase		
30	123,5 -125,2	59	DNA-Ligase	E oder Q	Wilson & Murray, 1979
rIII	127,1			(E oder Q)	
31	127,6 -128	16	Organisator des Kapsid-Proteins	E oder Q	
cd	131,7			(E oder Q)	
(pseT)	132,1 -132,9	30	dCMP-Desaminase, dNMP-3'-Phosphatase-5'-Polynukleotid-Kinase	(E oder Q)	Sirotkin et al., 1978
unf = alc	133,3		Transkription	(E oder Q)	
63	134,5 -135,75	42	RNA-Ligase	Q	
(psu SB)					
denA	137,25		Endonuklease II	(E oder Q)	

Tabelle 11: Fortsetzung

Genort[1]	Position[2]	Genprodukt ($MW \times 10^3 D$)	Genprodukt/Funktion	Promotor-klasse[3]	Referenz[4]
nrdB	138,0 -139,25	40	Ribonukleotid-Reduk-	(E oder Q)	
nrdA	139,25-141,5	80	tase, Untereinheit A und B	(E oder Q)	
td	142,3 -143,2	29	Thymidylat-Synthetase	(E oder Q)	
frd	143,2 -144,0	22	Dihydrofolat-Reduktase	(E oder Q)	
32	144,95-145,93	35	DNA-Bindeprotein	Q	
59	-147,05		DNA-Metabolismus	(E oder Q)	
33	147,1 -147,38	10	bindet an RNA-Polymerase	(Q)	
das = sua	-148,5		DNA-Metabolismus	(E oder Q)	
34	148,57-152,2	137,5	Schwanzfiber	L	s. Revel, 1981
35	152,2 -153,5	39	Schwanzfiber	L	
36	153,5 -154,16	24	Schwanzfiber	L	
37	154,16-157,16	110	Schwanzfiber	L	
38	157,16-157,9	27	Schwanzfiber-Zusammenbau	L	
t = stII	158,8			L	
mot = sip	159,42			(E)	
rV	160,0			(E oder Q)	
52	160,43-161,86	51	DNA-Topoisomerase-Untereinheit	E	
(mb)			Modifikation von suppressor tRNA	(E oder Q)	
ac	161,86-162,52			(E oder Q)	
(ama) (rs)				(E oder Q)	
stp	162,52-162,9			(E oder Q)	
ndd	162,9 -163,32	15		(E oder Q)	
pla 262	163,32-163,81			(E oder Q)	
denB	163,81-164,19		Endonuklease IV	(E oder Q)	
D1	164,19-165,08			(E oder Q)	
rIIB	165,08-166,0	33	Membran-Protein	E, Q	

Tabelle 11:

1) Die Bezeichnung der Genorte wurde den Arbeiten von Wood & Revel (1976) und von Mosig (1980) entnommen. Genorte in Parenthese wurden noch nicht eindeutig kartiert.

2) Abstand zum genetischen Nullpunkt in kb. Die Positionen wurden zunächst durch Klonierungsdaten (vgl. Tab. 9) und Molekulargewichte der Genprodukte, darüber hinaus durch Angaben bei Wood & Revel (1976) und Mosig (1980) festgelegt.

3) Die Klassifizierung der Promotoren wurde der Arbeit von Wood & Revel (1976) entnommen. Die Symbole bedeuten: E: early (früh), Q: quasi late, L: late (spät)(vgl. 1.2.).

4) Es wurden nur Referenzen angegeben, die nicht bei Wood & Revel (1976) oder Mosig (1980) aufgeführt sind.

Abbildung 20: Physikalische Karte des Phagen T4

a: Genorte s. Tab. 11

b: ClaI-, HindIII-, HpaII-Schnitte, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit kartiert wurden (vgl. Tab. 10 und die Kapitel 3.2., 3.4. und 3.5.).

c: EcoRI-Karte (oberhalb), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt wurde (vgl. 3.1.), bzw. BamHI-, SmaI-, KpnI-, BglII-, SalI-, XhoI-, XbaI- und HaeII-Karte nach Niggemann et al., 1981 (unterhalb).

d: Restriktionskarten nach: Fukada et al., 1980a, Wilson et al., 1977, 1979, Pribnow et al., 1981, Revel, 1981 (♀), Hänggi & Zachau, 1980 (♈), Krisch & Selzer, 1981 (♓), Mileham et al., 1980 (♈), Wilson, 1981 (♀). Es wurde jeweils ein EcoRI- oder HindIII-Schnitt an die in Tab. 10 angegebenen Schnitte angeglichen, alle weiteren Schnitte wurden, den Angaben der Autoren entsprechend, abgetragen.

e: Restriktionskarte nach O'Farrell et al., 1980.

f: Restriktionskarte nach Marsh & Hepburn, 1981.

g: Restriktionskarte nch Carlson, 1980.

h: Abstand zum genetischen Nullpunkt in kb.

Die Restriktionsendonukleasen wurden wie folgt abgekürzt: BamHI - Bam, SmaI - Sm, KpnI - K, BglI - Bg, BglII - B, SalI - S, XhoI - Xh, XbaI - X, HaeII - H, EcoRI - E, PvuI - Pv, PstI - P, HindIII - Hi, HpaII - Hp, ClaI - C, SacII - Sa, XmaIII - Xm.

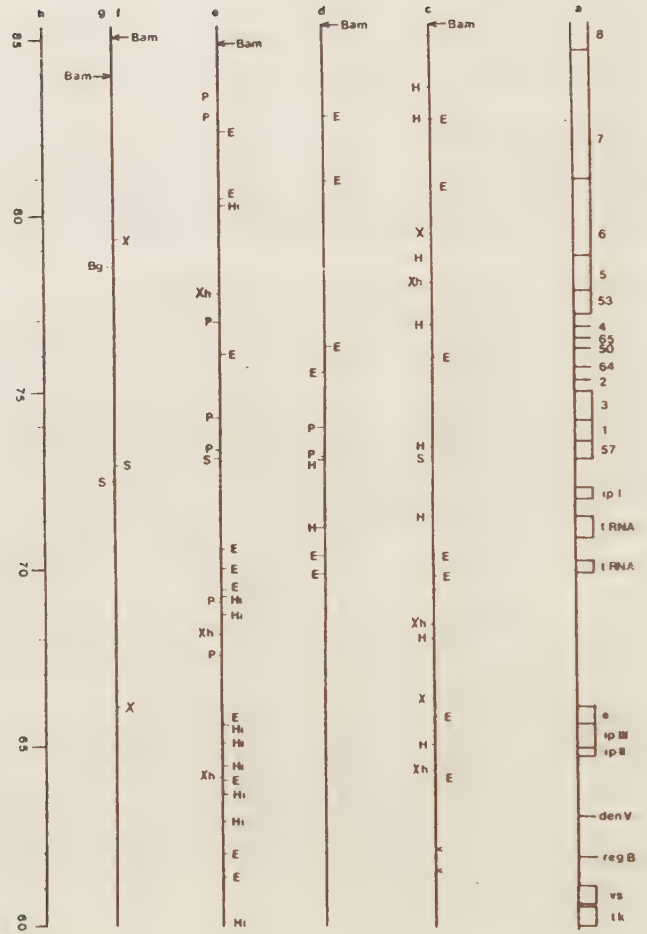


Abbildung 20:

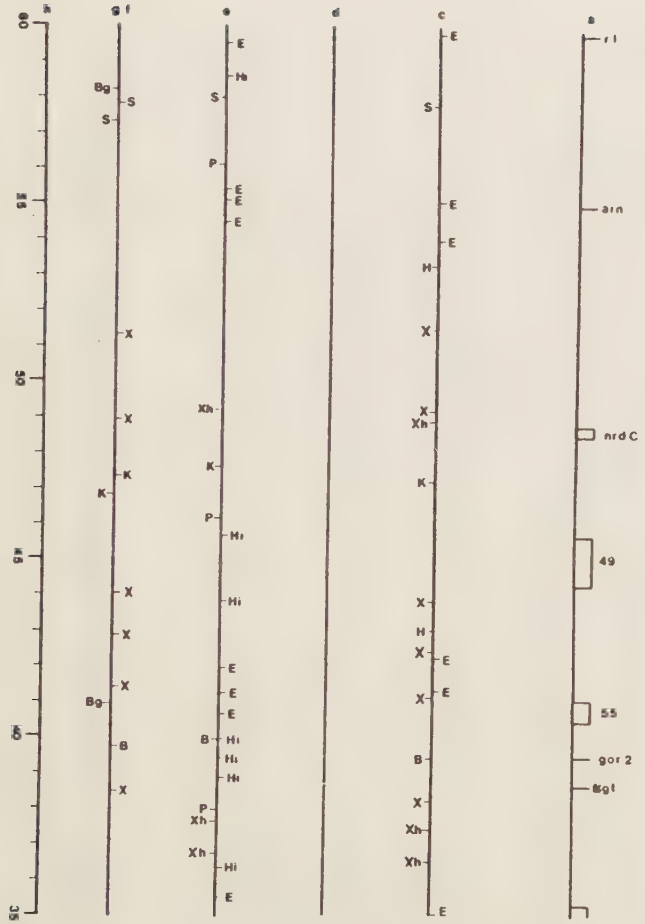


Abbildung 20: Fortsetzung

Abbildung 20: Fortsetzung

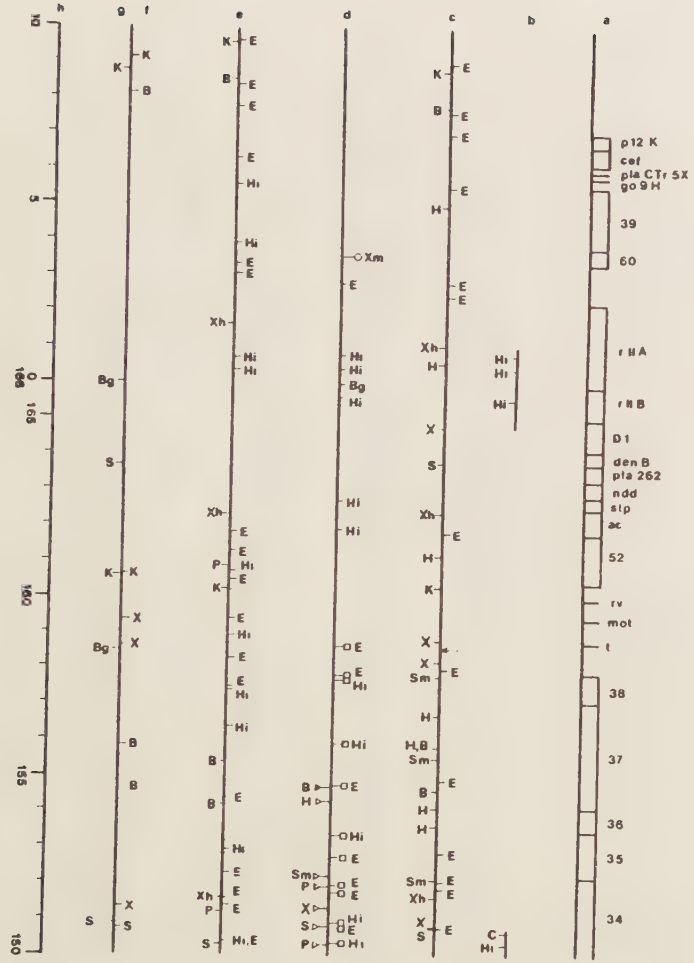


Abbildung 20: Fortsetzung

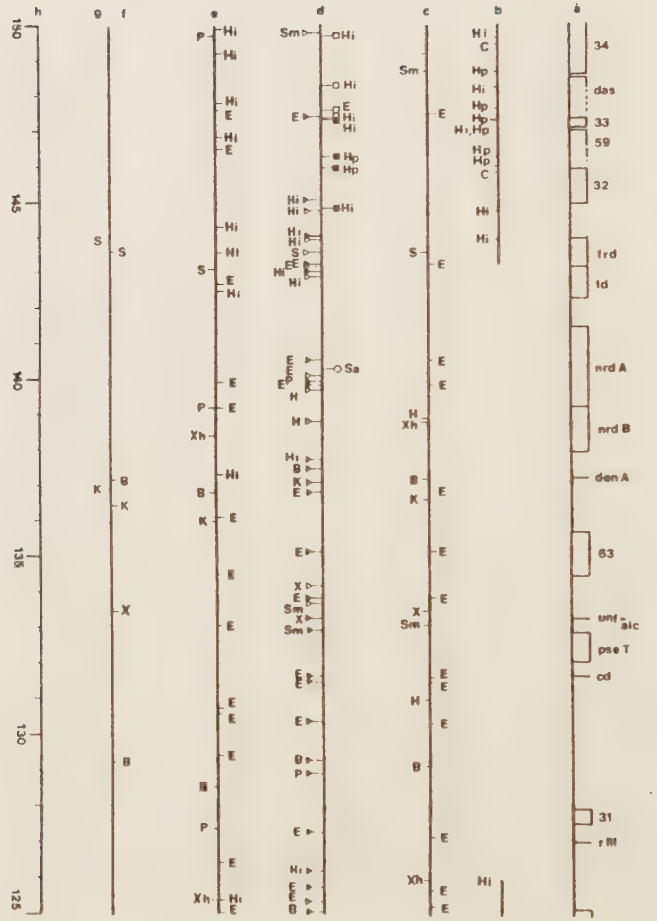


Abbildung 20: Fortsetzung

Abbildung 20: Fortsetzung

Abbildung 20: Fortsetzung

Schriftenverzeichnis

Niggemann, E.:
Die Zerlegung der DNA des Bakteriophagen T4 mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.
Diplomarbeit an der Abteilung für Biologie der Ruhr-Universität Bochum, Arbeitsgruppe Molekulare Genetik (1978)

Kiko, H., Niggemann, E., Rüger, W.:
Physical mapping of the restriction fragments obtained from bacteriophage T4 dC-DNA with the restriction endonucleases SmaI, KpnI and BglII.
Molec. Gen. Genet. 172, 303-312 (1979)

Rüger, W., Neumann, M., Rohr, U., Niggemann, E.:
The complete maps of BglII, SalI and XhoI restriction sites on T4 dC-DNA.
Molec. Gen. Genet. 176, 417-425 (1979)

Rüger, W., Niggemann, E., Green, I., Gaehtgens, J. M.:
The alignment of the physical and genetical maps of bacteriophage T4.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 246, 429-474 (1980)

Niggemann, E., Green, I., Meyer, H. P., Rüger, W.:
Physical mapping of bacteriophage T4.
Molec. Gen. Genet. 184, 289-299 (1981)

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. W. Rüger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Promotion und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. U. Winkler, an dessen Lehrstuhl diese Arbeit durchgeführt werden durfte.

Herrn Dr. E. R. Schmidt für viele wertvolle Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. R. Eichenlaub für die großzügige Bereitstellung von Enzymen und Vektor-Stämmen sowie für nützliche Hinweise bei der Klonierung von DNA.

Herrn Dr. E. Beck für die Einarbeitung in die Methode der DNA-Sequenzierung.

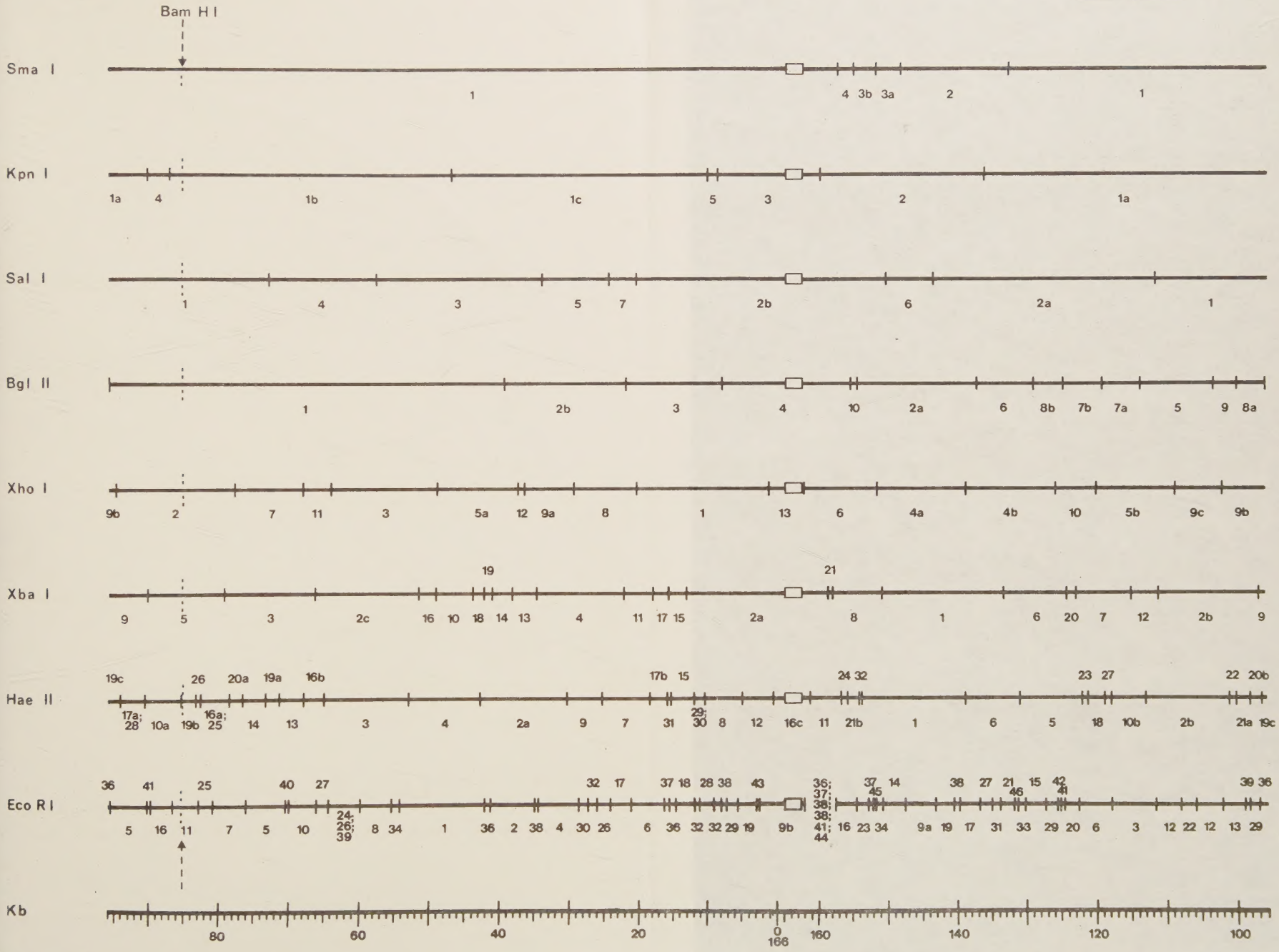
Herrn Prof. Dr. Fuchs für die Unterstützung bei der in vitro-Translation.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik, vor allem Frau U. Aschke und Herrn H. Gram, für freundliche Unterstützung und hilfreiche Diskussion.

Lebenslauf

2. 4. 1954	geboren in Dortmund
1960 - 1963	Besuch der Ostenberg-Volksschule in Dortmund-Barop
1963 - 1972	Besuch des Mallinckrodt-Gymnasiums in Dortmund
17. 5. 1972	Abitur
13. 10. 1972	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum für das Fach Biologie
8. 10. 1974	Vordiplom im Fach Biologie
27. 4. 1978	Diplomhauptprüfung im Fach Biologie Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie, Medizinische Virologie Diplomarbeit: Die Zerlegung der DNA des Bakteriophagen T4 mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.
Mai 1978	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen, Arbeitsgruppe Molekulare Genetik, Ruhr-Universität Bochum

Abbildung 21:



D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791